

UNIVERSITE DE LYON

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1962 N° 151

**RECHERCHES SUR QUELQUES MÉTABOLITES
INTERMÉDIAIRES PRÉSENTS
DANS LE SANG CHEZ LE CHIEN
(Essai d'application à la biochimie de l'hypothermie)**

Travail du Laboratoire de Physiologie (Directeur Pr H. HERMANN)
et du Laboratoire de Chimie Organique (Pr CHAMBON)

de la

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

T H È S E

présentée

à LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 30 Juin 1962

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

M. Pierre CHAMBON

né le 4 Mai 1930 à Lyon

F. ANDRÉ
5 rue Bugeaud
Lyon

UNIVERSITE DE LYON

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1962 N° 151

**RECHERCHES SUR QUELQUES MÉTABOLITES
INTERMÉDIAIRES PRÉSENTS
DANS LE SANG CHEZ LE CHIEN
(Essai d'application à la biochimie de l'hypothermie)**

Travail du Laboratoire de Physiologie (Directeur Pr H. HERMANN)
et du Laboratoire de Chimie Organique (Pr CHAMBON)

de la

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

T H È S E

présentée

à LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 30 Juin 1962

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

M. Pierre CHAMBON

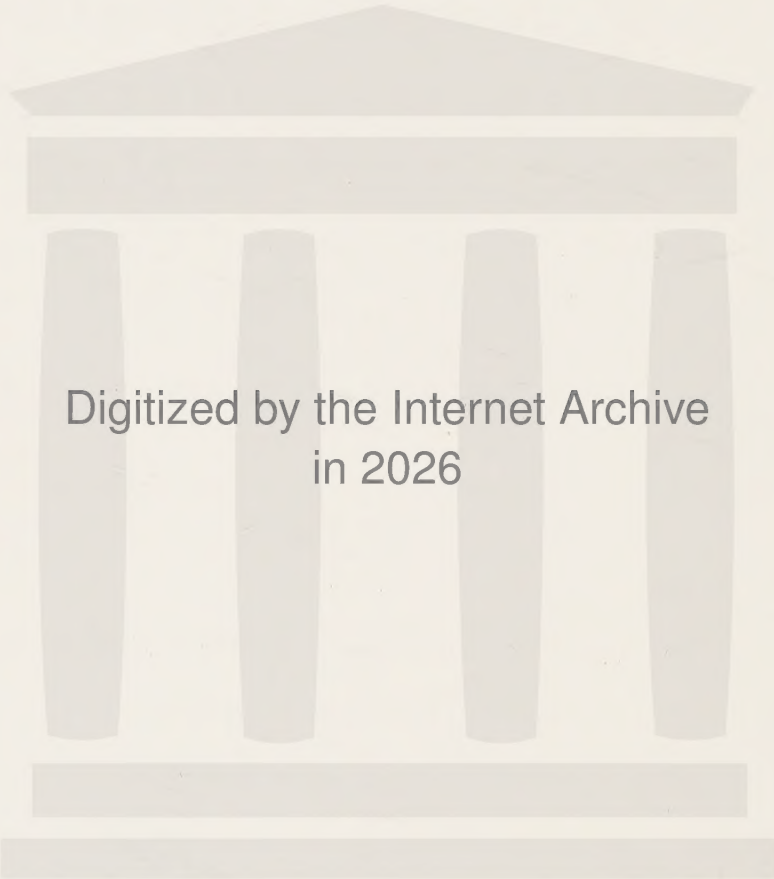
né le 4 Mai 1930 à Lyon

F. ANDRÉ

5 rue Bugeaud

Lyon





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire M. H. HERMANN : Doyen,
Membre de l'Institut Correspondant de
l'Institut

MM. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM.

HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile
REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique stomatologique
BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et cryptogamie

MM.

BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSSEL	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
KEHL	Histologie et embryologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales

Professeurs à titre personnel

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
DORCHE	Technologie pharmaceutique
CIER J. François	Physiologie
BERTOYE	Bactériologie

Professeurs sans chaire

ROMAN	Parasitologie
CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie
PERROT	Chimie organique et toxicologie

Maîtres de Conférences-Agrégés

Médecine

FEROLDI	Anatomie pathologique
CREYSSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie

MM.

BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN Jean-Paul	Paraistologie
MORET Robert	Physique
BOUCHET Alain	Anatomie
TOMMASI Michel	Anatomie pathologique
RIFFAT Georges	Hygiène
JOUVET Michel	Pathologie expérimentale
FAVRE-GILLY Jean	Hématologie

Pharmacie

ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie
MALLEIN René	Chimie analytique
GRAS Jean	Chimie biologique
PEYRIN Jean-Olivier	Physique

Agrégés en exercice

GUINET Paul	Médecine générale
PONT Maurice	Médecine générale
VIGNON Georges	Médecine générale
REVOL Louis	Médecine générale
PLAUCHU Marcel	Médecine générale
TRAEGER Jules	Médecine générale
MARION Pierre	Chirurgie générale
MICHAUD Pierre	Chirurgie générale
JAUBERT de BEAUJEU	Chirurgie générale
SAUTOT Jean	Chirurgie générale
GUILLEMIN Georges	Chirurgie générale
BURTHIAULT René	Obstétrique
GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
FRANCOIS René	Pédiatrie
FREIDEL Charles	Stomatologie
DEVIC Michel	Médecine générale
DESPIERRES Charles	Médecine générale
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
FRANCILLON Jacques	Chirurgie générale
SAUBIER Eugène	Chirurgie générale
COLOMB Daniel	Dermatologie
COLIN Marcel	Médecine légale
TOLOT François	Médecine du Travail
GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT Bernard	Neuro-Psychiatrie
DUMONT Martial	Obstétrique

MM.

BONNAMOUR Georges	Ophtalmologie
DURAND Louis	Urologie
GARDE Alexandre	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
LARBRE François	Médecine générale
MORNEX René	Médecine générale
NORMAND Jean	Médecine générale
MARET Gilbert	Chirurgie générale
DESCOTES Jacques	Chirurgie générale
CHASSARD Jean-Louis	Electro-radiologie
ALLEGRE Georges	Neuro-chirurgie
HUGONNIER René	Ophtalmologie
FAYSSE Robert	Orthopédie
GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
KALBE Jean-Claude	Pneumo-Phtisiologie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM.

Professeur H. HERMANN, Président
Professeur J.F. CIER
Professeur L. PERROT
Professeur Agrégé J. FRANCILLON

A MA MERE

A MON PERE

C'est à lui que je dois le meilleur de ma formation scientifique. Il m'a beaucoup appris par l'amplitude de ses connaissances et la rigueur de sa méthode.

En témoignage d'affection et de reconnaissance.

A MES BEAUX-PARENTS

en affectueux hommage.

A MA FEMME

qui a accepté sans se plaindre les nombreuses contraintes imposées par ce travail.

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Doyen Henri HERMANN

Professeur de Physiologie
à la Faculté de Médecine et Pharmacie

Membre correspondant de l'Institut
et de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'Honneur

Il a bien voulu nous accueillir
dans son laboratoire et nous faire
l'honneur d'accepter la présiden-
ce de ce jury.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de notre grande re-
connaissance et de notre profond
respect.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur J.F. CIER

Il nous a confié le sujet de ce travail et mis à notre disposition les ressources de son laboratoire pour la partie physiologique.

Qu'il veuille bien accepter le témoignage de toute notre gratitude.

Monsieur le Professeur L. PERROT

Nous avons pu bénéficier de son enseignement dès le début de nos études. Il a suivi l'élaboration de ce travail avec un bienveillant intérêt et il nous fait l'honneur de faire partie de notre jury.

Nous tenons à lui témoigner notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé J. FRANCILLON

Au cours d'un stage prolongé dans son service de Chirurgie où il a bien voulu nous accueillir, nous avons pu bénéficier de la richesse de son enseignement et de la discipline de son art.

Qu'il soit assuré de notre gratitude et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Agrégé P. MICHAUD

Nous avons pu apprécier depuis longtemps la cordialité de son accueil. Il a bien voulu contribuer à la réalisation pratique de ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX

La survenue de la fibrillation ventriculaire au cours des réfrigérations provoquées chez les Mammifères non hibernant, reste depuis l'introduction de cette méthode un des incidents classiques de l'hypothermie. Des travaux de synthèse ont repris les observations, les interprétations, proposé des palliatifs sans pour autant résoudre le problème.

En rappelant les théories dites du "foyer ectopique" et du "mouvement circulaire", MANCUSSO et SULFINA (95) admettent que la suppression de l'harmonie dans les temps de conduction intra-myocardique, est un des facteurs importants dans la genèse de cette fibrillation ventriculaire. Mais ceci n'est qu'une modalité d'expression qui cache notre ignorance. Conductibilité et contractilité sont liées à la vie même des cellules, c'est-à-dire à leur métabolisme. Or l'inactivation des systèmes enzymatiques, inactivation liée à l'abaissement de la température peut être envisagée.

O. BENOIT, J.F. CIER et TANCHE (42) regroupant les données de la littérature et celles de leur expérimentation personnelle concluent que sans aucun doute "le problème de la résistance du coeur des Mammifères à l'hypothermie est d'ordre biochimique...Seule la connaissance exacte des viciations métaboliques et de leur ordre d'apparition au cours de la réfrigération progressive permettra d'opposer à la défaillance de l'automatisme et sans doute à la fibrillation, une prophylaxie qui ne sera plus aveugle."

Des travaux de BING (31) montrant la relation entre la force de contraction et l'activité de la phosphorylase, tendent à mettre en cause les catécholamines. Plus récemment, COVINO et D'AMATO (44) insistent sur la participation du ralentissement des activités enzymatiques. Ils ont constaté avec HANNON (43, 66), à 20°-21°, une brusque cassure dans les courbes liant l'activité de différents paramètres à la température. Vers 20°, un certain nombre de phénomènes biologiques changeraient leur coefficient d'activité vis-à-vis de la loi de VAN T'HOFF-ARRHENIUS. Des perturbations dans le métabolisme oxydatif des acides du cycle citrique conduiraient à une diminution de la production d'ATP. Selon ces auteurs, il en résulterait une diminution du potentiel de repos cellulaire directement responsable d'un ralentissement de la vitesse de conduction. C'est ce trouble de conduction qui favorise le développement d'un mouvement circulaire, induisant la fibrillation ventriculaire.

Sans doute est-il un peu prématuré d'admettre définitivement cette hypothèse, mais il est bien établi que le métabolisme intermédiaire est lié à la production d'ATP et la dépression par le froid de ce système bouleverserait tout un "complexe" travaillant en homéothermie.

C'est sur la base de cette hypothèse qu'ont été entreprises les recherches dont les résultats sont rapportés dans ce travail. Les techniques analytiques actuellement utilisées, la chromatographie sur papier et les procédés de dosage enzymatique, mettaient en particulier à notre disposition des moyens permettant l'exploration du métabolisme intermédiaire du coeur au cours de l'hypothermie.

CHAPITRE I

Métabolisme intermédiaire et activité contractile du myocarde

Le problème du métabolisme du myocarde et des rapports qui unissent le métabolisme, la structure du muscle et la production d'énergie mécanique a été souvent étudié. Trois Symposium récents en particulier lui ont été consacrés :

- . Struktur und Stoffwechsel des Herzmuskel (161)
- . Symposium on the myocardium : its biochemistry and biophysics (160)
- . Symposium on the physiology of cardiac muscle (162)

Dans ce dernier ouvrage, D.E. GREEN et R.F. GOLDBERGER (64) font le point actuel des connaissances sur le métabolisme du muscle cardiaque. Ce muscle dont les activités métaboliques sont un reflet de sa fonction principale, a un rôle physiologique essentiellement orienté vers la production d'un travail mécanique. Son organisation métabolique tend presque uniquement à la livraison d'une énergie facilement transformable en activité mécanique et les processus synthétiques du myocarde sont essentiellement limités à ceux qui doivent en maintenir la fonction.

La dégradation enzymatique qui se fait à partir des éléments nutritifs apportés par le sang circulant pour se terminer en gaz carbonique et eau, joue son rôle sur les trois grandes classes de substrats : glucides, lipides et acides aminés. Si certaines étapes sont différentes, toutes convergent vers la plaque tournante du métabolisme intermédiaire : le cycle de KREBS. A ce cycle des acides tricarboxyliques est lié un autre système capable de capter l'énergie libérée, c'est le système de la phosphorylation oxydative.

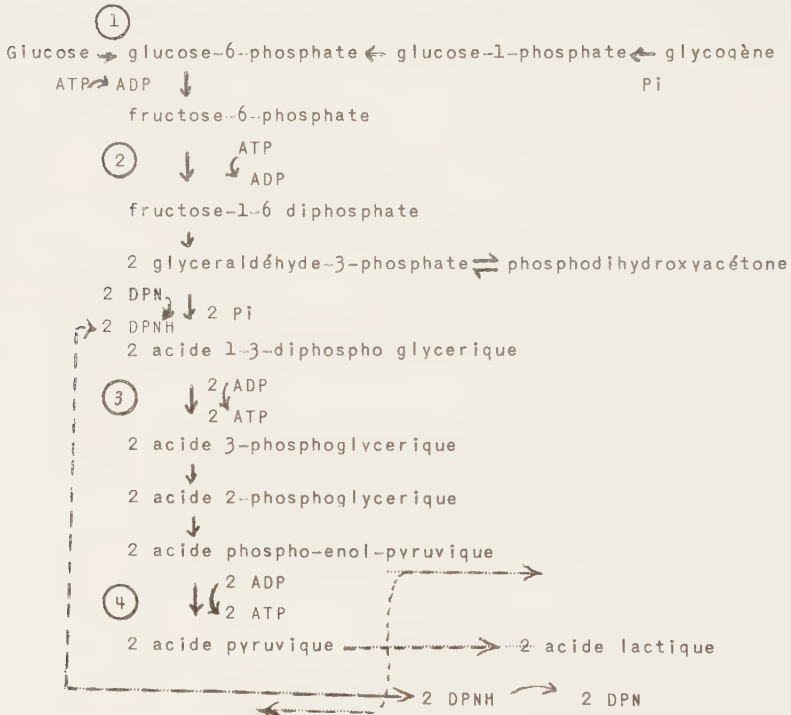
1° -- METABOLISME DES GLUCIDES ET CYCLE CITRIQUE

La dégradation des hydrates de carbone jusqu'au gaz carbonique et à l'eau, se fait en deux étapes :

- a) une voie anaérobie
- b) une voie aérobie.

a) Métabolisme en anaérobiose

A cette première partie, on rattache généralement le nom d'EMDEN, MEYERHOF et PARNAS. Elle se situe dans le cytoplasme de la cellule où le glucose et le glycogène sont dégradés par une série d'enzymes jusqu'au pyruvate :



Le gain net d'énergie chimique utilisable, dérivée de la glycolyse, peut être calculé à partir de la balance des molécules d'adenosinetriphosphate (ATP) consommées et régénérées.

Par molécule de glucose dégradé, il y a formation de quatre molécules d'ATP (réaction 3 et 4) par un processus de transfert des liaisons phosphates hautement énergétiques du substrat à l'adenosinediphosphate (ADP). Mais puisque deux molécules d'ATP sont consommées dès le début de la glycolyse (réaction 1 et 2), le gain net serait seulement de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose consommé.

Mais lors de l'utilisation des phosphates inorganiques au moment du passage du glyceraldehyde-3-phosphate à l'acide 1,3-diphosphoglycérique, il y a réduction de 2 molécules de DPN en DPNH. Comme à une molécule de DPNH est attachée la formation de trois molécules d'ATP (1), il y a là une source de molécules d'ATP et en fin de compte, le passage du glucose à deux molécules de pyruvate aboutit à la synthèse de 8 molécules d'ATP ou plus exactement de huit liaisons $\sim P$.

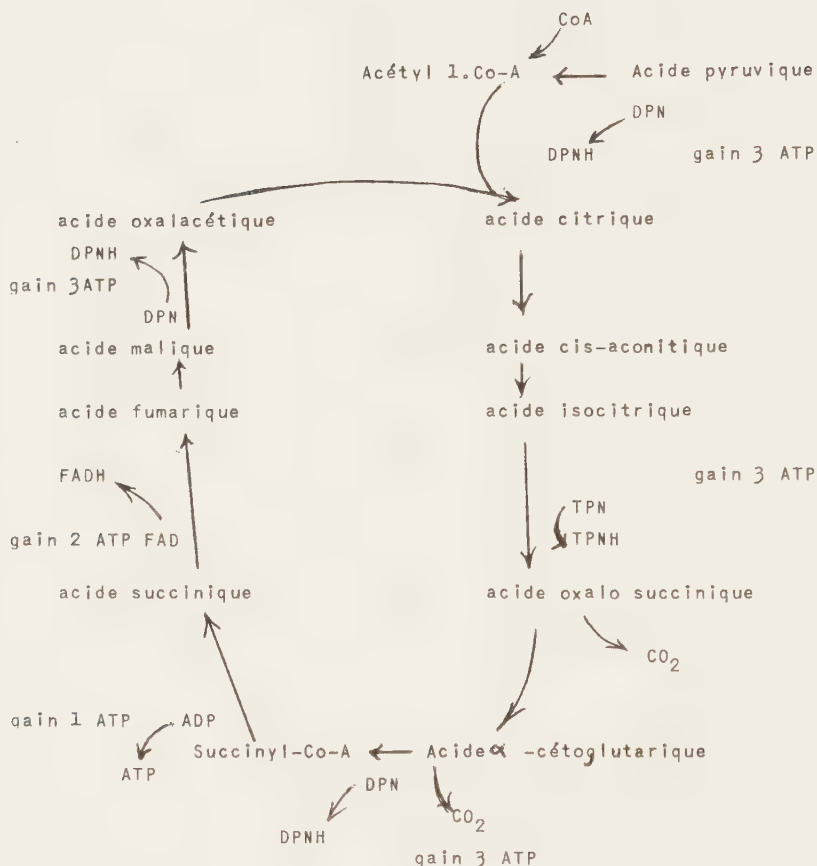
En anaérobiose, le pyruvate formé est réduit pour donner du lactate, selon une réaction catalysée par la lactico-deshydrogénase dans laquelle le donneur d'hydrogène est le diphosphopyridinenucléotide réduit (DPNH).

b) En métabolisme aérobie, le pyruvate rentre dans une nouvelle chaîne de réactions enzymatiques connue sous le nom de cycle de KREBS, cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques. Les premières bases de ce cycle ont été posées par MARTIUS et KREBS (88, 89, 90).

(1) Schématiquement on peut admettre :

$DPN \rightleftharpoons DPNH$	$3 \sim P$
$TPN \rightleftharpoons TPNH$	$3 \sim P$
$FAD \rightleftharpoons FADH$	$2 \sim P$

Cet enchaînement d'acides di- et tri- carboxyliques a pu être présenté comme une "machine à brûler l'acide pyruvique" (POLONOVSKI (128)).



Au cours des réactions de ce cycle citrique cinq des réactions sont accompagnées de production d'ATP à partir d'ADP et de phosphates inorganiques (Pi) : ce sont des oxydations c'est pourquoi ces phosphorylations sont dites oxydatives.

Ces phosphorylations oxydatives sont couplées, par des systèmes oxydo-réducteurs, à des réductions. Les électrons libérés au cours de ces oxydations sont pris en

charge par une série d'enzymes et de coenzymes collectivement connus sous le nom de "système mitochondrial de transport d'électrons". C'est pendant cette navette d'électrons, dans ce système mitochondrial, que se produit l'estérification des phosphates inorganiques:

Les cinq oxydations du cycle de KREBS qui sont couplées à des phosphorylations sont :

	mol. $\sim$ P formées
1 ^o oxydation du pyruvate en acétyl-Co-A	3
2 ^o oxydation de l'isocitrate en oxalosuccinate et CO ₂	3
3 ^o oxydation de l' α -cétoglutarate en acide succinique et CO ₂	4
4 ^o oxydation du succinate en fumarate	2
5 ^o oxydation du malate en oxalacétate	3
	15

En dehors de la réaction 4 qui met en jeu le FAD (flavine adenine dinucleotide) pour transporter l'électron libéré de l'oxydation du succinate, les autres réactions nécessitent la participation du DPN et du TPN.

Ainsi le gain en ATP formé par la dégradation d'une molécule d'acide pyruvique est de 15 liaisons riches $\sim$ P. Comme le métabolisme anaérobie du glucose conduit à deux molécules de pyruvate par molécule de glucose, ce sont donc 30 liaisons $\sim$ P qui sont ainsi synthétisées.

Si on totalise le gain d'ATP formé à partir du glucose initial, et compte-tenu de la formation de DPNH lors de l'oxydation du glyceraldehyde-3-phosphate, lors de la dégradation anaérobie du glucose, on trouve :

	mol. $\sim$ P formées
glucose + O ₂ $\rightarrow$ 2 pyruvate + 2 H ₂ O	8
2 pyruvate + 2 oxaloacétate + O ₂ $\rightarrow$ 2 citrates + 2 CO ₂	6
2 citrate + 4 P ₂ $\rightarrow$ 2 oxaloacetate + 4 H ₂ O + 4 CO ₂	24
	38

En somme :



C'est la dégradation à l'intérieur du système mitochondrial qui a réalisé la majeure partie de ce gain (30 sur 38).

2° - METABOLISME DES LIPIDES

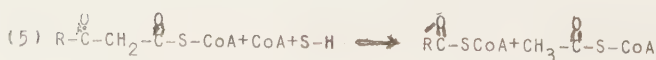
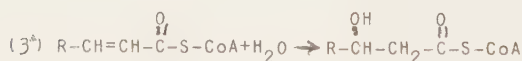
Si la première étape de saponification, d'hydrolyse enzymatique, n'est pas nécessaire pour la faible quantité d'acide gras présents dans le sang circulant, elle est indispensable pour l'utilisation des glycérides. Le glycérol issu de cette hydrolyse est oxydé en glycéraldéhyde et consommé par la voie du métabolisme des trioses.

Les enzymes nécessaires à la dégradation des acides gras en gaz carbonique et eau sont contenus dans les mitochondries.

Le processus généralement admis est le processus de la β -oxydation, proposé depuis plus de 50 ans par KNOPP: basé sur la séparation de 2 unités de carbone à partir de l'acide gras initial pair synthétisé par les systèmes anabolisants animaux et végétaux.



Cette séquence est répétée ainsi de suite jusqu'à ce qu'il ne reste que des fragments de 2 atomes de carbone. Les fragments à deux atomes de carbone, fournis à chaque étape, sont dégradés en CO_2 et H_2O , par entrée dans le cycle citrique sous forme d'acétyl-Co-A.



La première étape est la formation d'ester du coenzyme A (Co-A) et d'acide gras libre; elle nécessite la présence d'ATP pour former un acyl-Co-A (1°).

Ensuite le Co-A est oxydé par une flavo-protéine (acyldéhydrogénase) pour former le dérivé insaturé correspondant (2°). Dans cette réaction, les électrons enlevés par l'acyldéhydrogénase sont passés sur un autre enzyme flavo-protidique, "enzyme transporteur d'électron" (ETF) et ensuite passés au système mitochondrial de transport d'électrons, cependant qu'à ce flux d'électrons est couplée la formation d'ATP.

La réaction suivante est l'hydratation du composé insaturé, pour former le dérivé hydroxy-acyl-Co-A (3°), suivie d'une autre déhydrogénation. Les électrons libérés sont passés sur le DPN. Le DPNH formé est oxydé par les mitochondries tandis que se forment trois molécules d'ATP.

L'étape finale dans le cycle oxydatif des acides gras est le clivage qui libère l'acétyl-Co-A formé et aussi l'ester-Co-A d'un nouvel acide gras raccourci de deux atomes de carbone par rapport à l'acide gras initial.

Cet acide gras ainsi amputé entre dans la réaction de dégradation par la réaction (2°), puisqu'il est déjà estérifié par le Co-A.

Ainsi la molécule d'ATP nécessaire à la formation de l'ester-Co-A de l'acide gras initial est seulement utilisée une fois dans le processus entier de la dégradation de l'acide gras.

On admet actuellement le décompte suivant, dans la production d'ATP à partir d'un acide gras :

Mol. P ~ formées

Acide palmitique + 70 ₂ → 8 acétyl	40
8 acétyl + 16 O ₂ → 16 H ₂ O + 16 CO ₂	96
	136

L'acétyl-Co-A provenant de chaque tour du cycle d'oxydation de l'acide gras est condensé avec l'oxalacétate par "l'enzyme de condensation" d'OCHOA pour former du citrate.

Si l'acide gras initial ne contient qu'un nombre pair d'atomes de carbone, le dernier maillon se trouve être de l'acétyl-Co-A. Mais si l'acide gras initial en possède un nombre impair, le dernier fragment est l'acide propionique qui peut être converti directement en acide succinique par fixation de CO_2 selon OCHOA. (116) LARDY et ADLER (1).

La dégradation des acides gras est ainsi liée à la production d'ATP de quatre manières :

1° - par la flavoprotéine transporteuse d'électrons ETF qui véhicule les électrons libérés au cours de la deuxième étape, au système transporteur d'électrons.

2° - par le DPN qui transporte les électrons libérés dans les quatre étapes, au système transporteur d'électrons.

3° - par la production d'acétyl-Co-A qui est conduit au cycle citrique par condensation avec l'oxalacétate.

4° - par la production d'acide propionique qui, par fixation de CO_2 , peut entrer dans le cycle comme succinate.

Le lien fonctionnel entre le cycle oxydatif des acides gras et le cycle citrique montre l'importance et la proximité de ces deux systèmes métaboliques. Le cycle oxydatif des acides gras ne peut fonctionner que sous la dépendance du cycle citrique :

1° - sans ATP fabriqué par le cycle citrique, la première étape (1°) ne peut se produire;

2° - sans production d'oxalacétate, il n'y a pas de partenaire de condensation avec l'acétyl-Co-A formé par l'oxydation des corps gras.

Une accumulation d'acétyl-Co-A empêche la libération de Co-A et bloque ainsi l'oxydation ultérieure des acides gras. Cependant la condensation de deux molécules d'acétyl-Co-A peut se produire pour former de l'acétoacétyl-Co-A dont la dégradation n'est pas possible dans le muscle cardiaque, mais seulement dans le foie d'où il est renvoyé comme acétyl-Co-A; cet acétoacétate peut, de plus, être réduit, par une déhydrogénase, en acide β -hydroxybutyrique, simultanément à l'oxydation du DPNH.

3° - METABOLISME DES AMINO-ACIDES

Comme l'a montré BING (21), la contribution du métabolisme des aminoacides n'est pas négligeable dans le bilan énergétique du myocarde. Les acides aminés sont soumis à deux types de réactions destinées à leur enlever le groupement aminé et à leur permettre l'entrée dans le cycle citrique : ce sont la désamination et la transamination. Cette dernière est la plus importante dans les tissus de grande activité métabolique et en conséquence dans le myocarde.

C'est le transfert du groupe aminé, par une transaminase dépendante de la participation de dérivés phosphorylés du pyridoxal, qui permet le passage de l'acide aminé au céto-acide correspondant.



Mais par la voie de la désamination, d'autres acides peuvent pénétrer dans le cycle citrique. Selon que la dégradation des acides aminés conduit directement à des acides cétoniques, chaînons du cycle citrique, certains acides aminés sont appelés "glycogéniques". D'autres qui arrivent au cycle citrique par la voie de l'acétoacétate sont des acides "cétogènes". Un certain nombre d'entr'eux participent aux deux circuits.

En résumé, le cycle citrique apparaît donc comme le carrefour auquel arrivent les petites molécules produites par les métabolismes particuliers. Celles-ci sont conduites au gaz carbonique et à l'eau avec production d'énergie.

*

* *

Dans les réactions chimiques, une oxydation est toujours liée à une réduction; au cours de ces réactions d'oxydoréductions couplées, le transfert des électrons se réalise par leur transmission d'une substance à une autre, pour arriver finalement jusqu'à l'oxygène. Au cours de ce transport d'électrons, à travers le système "mitochondrial de transfert d'électrons", la série d'oxydo-réduction est accompagnée d'une libération d'énergie. Si cette énergie est souvent perdue sous forme de chaleur, dans un petit nombre d'oxydo-réductions spécifiques, elle est captée par l'estérification de phosphates inorganiques et conservée en liaisons riches sous forme d'ATP.

On connaît certains éléments du système de transport d'électrons : deux flavoprotéines, quatre cytochromes, le coenzyme Q, le fer non-hémique et le cuivre. Les électrons éliminés par les quatre oxydations du cycle de KREBS pénètrent dans la chaîne de transport par le DPN, réduit en DPNH. Il donne ces électrons au système transporteur par deux flavoprotéines (fs et fd), les transporteurs successifs étant vraisemblablement le fer, le coenzyme Q, le cytochrome c_1 , le cytochrome c, le cytochrome a, le cuivre et finalement l'oxygène.

Des études récentes montrent que pour différents substrats indépendants du DPNH, certains transporteurs d'électrons permettent cependant l'entrée des électrons dans le système transporteur mitochondrial : il existerait deux chaînes, l'une pour le succinate et l'autre pour le DPNH, que l'on a essayé de représenter ainsi schématiquement :

Succinate $\rightarrow$ fs $\rightarrow$ Fe $\rightarrow$ Co Q $\rightarrow$ cyt c_1 $\rightarrow$ cyt c $\rightarrow$ cyt a $\rightarrow$ Cu $\rightarrow$ O

Lactate
Malate
Autres
substrats

} ? $\rightarrow$ cyt b

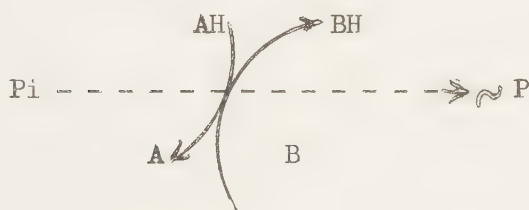
DPNH $\rightarrow$ fd $\rightarrow$ Fe $\rightarrow$ Co Q $\rightarrow$ cyt c_1 $\rightarrow$ cyt c $\rightarrow$ cyt a $\rightarrow$ Cu $\rightarrow$ O₂

Si le processus de la phosphorylation oxydative est découvert depuis 1939, son intégration dans le cycle citrique et dans le transport d'électrons est plus récente. La phosphorylation oxydative fait la liaison entre l'estérification des phosphates et les oxydo-réductions qui

se passent avec le flux d'électrons à travers ce système mitochondrial de transport d'électrons.

Au cours du transfert d'électrons d'une molécule de DPNH à l'oxygène, on estime la libération d'énergie à environ 52.000 calories, tandis que du succinate à l'oxygène, elle n'est que de 37.000 calories. Si la formation d'ATP à partir de P inorganique et d'ADP absorbe 7.700 calories, le calcul montre que les trois molécules d'ATP formées à partir du DPNH en exigent environ 23.000. Celles formées à partir du succinate en absorbent donc environ 15.000. A chaque étape il y a une assez grande perte d'énergie dissipée en chaleur.

La phosphorylation oxydative peut être ainsi schématisée :



Où A et B sont deux membres consécutifs du système transporteur d'électrons.

ROLE DE CES LIAISONS HAUTEMENT ENERGETIQUES DANS LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Toute cette énergie chimique libérée par le cycle de KREBS et "chargée" sous forme d'ATP, est destinée à fournir de l'énergie mécanique, lors de la contraction musculaire.

Depuis les travaux de HILL (73) et MEYERHOF (103), nombreuses ont été les hypothèses tendant à expliquer le lien entre énergie chimique et travail de la myofibrille. La découverte de la myosine par KÜHNE (86) en 1864, celle de l'actine par SZENT-GYÓRGYI ont conduit à l'étude de la contraction musculaire in vitro. Selon HUXLEY (76) "une découverte encore plus remarquable peut-être" a été celle de la possibilité d'extraire du muscle des fibres d'actine et de myosine qui se contractent quand on les place dans une solution appropriée d'ATP.

Des articles récents de HERAUD (72), OLSON (117) précisent l'état de nos connaissances sur cet appareil contractile.

La myosine constitue la majeure partie de la myofibrille, son poids moléculaire serait compris entre 400.000 et 500.000 selon LAKI et CARROLL (91). On sait que c'est une protéine fibreuse typique et on pensait qu'une modification de sa configuration était le facteur responsable de la contraction musculaire. La myosine est douée d'une activité enzymatique hydrolysante vis-à-vis de l'ATP. Cette activité ATP-ase, découverte par ENGELHARDT et LJUBIMOVA (53) est liée à l'intégralité de la molécule, sous la dépendance de ses groupes SH (SINGER (148)) et de sa richesse en calcium (KIELLEY et BRADLEY (83)). On note aussi un antagonisme entre le potassium qui l'active et le sodium qui s'oppose à cet effet ATP-ase. Le magnésium paraît aussi être un activateur de la myosine.

L'actine, autre constituant de la myofibrille est en proportion beaucoup plus faible (12 à 15 p.100 des protéines de la myofibrille). Elle existe en solution sous deux formes différentes : une forme globulaire (Actine G) de poids moléculaire 70.000 environ, qui se dimérise facilement, en milieu salin, en actine fibrillaire (Actine F).

Si on mélange des solutions d'actine et de myosine, il se forme un complexe dont les propriétés physiques ne correspondent plus à la somme des propriétés de chaque composant : un nouveau complexe est ainsi formé, c'est l'Actomyosine. Elle est probablement un artéfact in vitro, mais c'est un modèle qui peut servir à élucider une partie des problèmes de la contraction musculaire : en effet si dans certaines conditions on traite par l'ATP un gel d'actomyosine orienté en fils, le gel se raccourcit avec division de l'ATP en ADP et P inorganique, le complexe étant ensuite dissocié en ses éléments (GERGELY et HUXLEY (62)).

Les connaissances biochimiques peuvent se résumer ainsi (HUXLEY (76)) :

1° - La structure contractile est formée en grande partie de deux protéines : actine et myosine.

2° - Une sorte de combinaison peut se produire entre actine et myosine.

3° - Cette combinaison est modifiée par la présence d'ATP.

4° - La myosine est un enzyme pour la déphosphorylation de l'ATP.

5° - Cette déphosphorylation de l'ATP est étroitement liée à la libération d'énergie utilisée pour la contraction.

6° - La présence d'ATP sans déphosphorylation rend la structure contractile extensible.

7° - En l'absence d'ATP, la structure contractile devient rigide et inextensible.

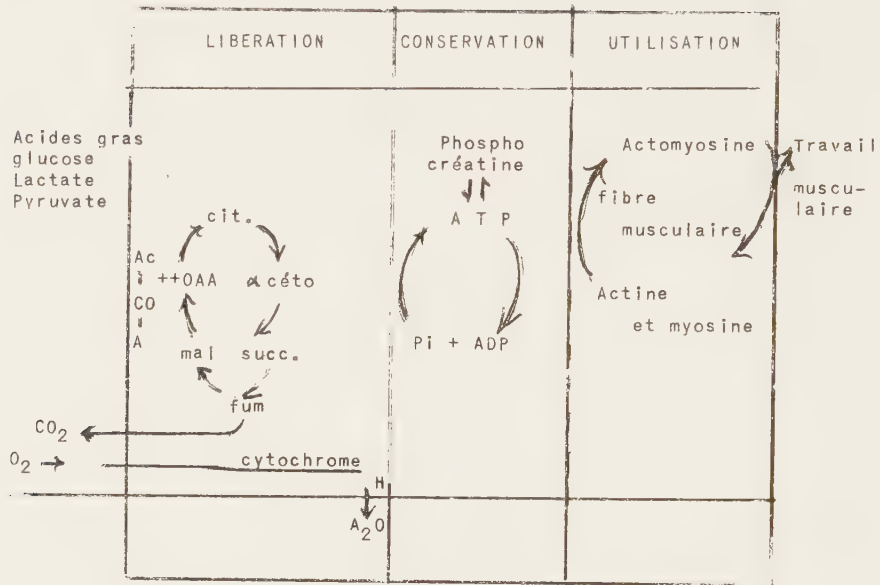
Mécanisme de la contraction

Au repos, les faisceaux de filaments d'actine et de myosine ne sont pas liés l'un à l'autre par suite de la présence de l'ATP et de son intégrité. Une stimulation libérerait un activateur provoquant la décomposition enzymatique de l'ATP; il se produit une inter-réaction entre myosine, actine et ATP, il en résulte que le faisceau d'actine pénètre plus avant dans le faisceau de filament de myosine, ce qui amène le raccourcissement du muscle. Selon STRAUB (154), c'est la polymérisation d'actine G en actine F qui serait la réaction cruciale dans la contraction musculaire. Des travaux de LEVY et KOSLAND (92) permettraient d'envisager la formation d'un composé à courte vie (phospho-myosine) qui serait la substance clé du transfert de l'énergie de l'ATP à la protéine contractile.

Le rendement de la conversion d'ATP en travail mécanique dans le muscle cardiaque peut varier beaucoup, de 10 à 60 % indiquant que le couple utilisation d'ATP et actomyosine est considérablement moins bon que le couple transporteurs d'hydrogène et formation d'ATP.

Selon OLSON (117), le schéma de la production de l'énergie et de son utilisation dans le muscle cardiaque

pourrait être le suivant :



CHAPITRE II

Particularités métaboliques du cœur en normothermie

Les études entreprises sur des coeurs isolés perfusés ou sur des coupes de myocarde ont fait ressortir que le tissu myocardique possédait une grande facilité d'adaptation à l'utilisation d'apports nutritifs variés.

Certes, il semblerait préférable de pouvoir expérimenter sur le coeur, in situ, battant dans la cage thoracique fermée. Mais BING (23), promoteur cependant d'une technique permettant l'étude précise du métabolisme du coeur in situ, expose ce que l'on doit aux méthodes d'étude in vitro : les coupes de tissus, les homogénats ont permis de mieux connaître les substrats utilisés; les processus métaboliques sont mieux exposés à l'intervention directe de l'expérimentateur.

En effet, si le coeur humain ou animal, battant dans son milieu naturel, normothermique, à thorax fermé, peut être soumis à des recherches non perturbées par les influences extérieures, on ne peut connaître le métabolisme intermédiaire que par des analyses comparatives du sang afférent et efférent.

Malgré ces réserves, il faut reconnaître aux travaux de BING (16, 17), une valeur importante : sa méthode de cathétérisme cardiaque, permet la perfusion des artères coronaires et le cathétérisme du sinus coronaire. Un catheter dans le coeur droit et un autre dans l'artère fémorale permettent la récolte de sang artériel et veineux somatique. Une méthode particulière au protoxyde d'azote empruntée à KETTY et SCHMIDT (84) permet de connaître le débit coronaire, malgré certaines réserves sur l'unicité du drainage du sang effluent par le sinus coronaire.

En reprenant les données obtenues depuis 15 ans et celles d'autres auteurs, BING (30) présente l'état actuel de nos connaissances sur les capacités qu'a le coeur d'extraire des matériaux énergétiques à partir du sang qui le vascularise. On sait depuis longtemps que le coeur peut utiliser le glucose, l'acide pyruvique et l'acide lactique. La préparation coeur-poumon avait permis de mettre en évidence que le lactate était de loin la substance la plus importante, le glucose servant à la formation du glycogène.

Les études de BING (20, 22, 23, 25) sur coeur "in situ" ont confirmé :

- l'affinité du myocarde pour le glucose dont l'extraction est une fonction du taux artériel : pour une concentration artérielle de 80 mg p. 100, la différence artério-veineuse est inférieure à 4 mg p. 100, avec un maximum à la concentration de 110 mg p. 100; elle ne se fait plus au-dessous de 70 mg p. 100.

- le lactate est utilisé à partir d'un seuil de 2,5 mg p. 100 et pour ROTHLIN (32) sa consommation est préférentielle à celle des autres substrats.

- l'extraction du pyruvate est proportionnelle à sa concentration plasmatique. Mais celle-ci est faible et le seuil est 0,6 mg p. 100.

- le fructose ne paraît pas utilisé.

La quantité d'oxygène liée au catabolisme de ces éléments ne représente que 35 p. 100 de l'oxygène total utilisé par le myocarde. Le tableau I, emprunté à BING (23), fait ressortir la part respective prise par les substrats de nature glucidique et ceux fournis par les autres matériaux énergétiques dans les oxydations au niveau du coeur.

TABEAU I

Contribution relative des matériaux glucidiques et non glucidiques dans l'utilisation de l'oxygène extrait par le myocarde

glucose	17,90	acides gras	67
pyruvate	0,54	acides aminés	5,60
lactate	<u>16,46</u>	cétones	<u>4,3</u>
	34,90 p.100		76,9 p.100

Ainsi donc, la participation des lipides au métabolisme du myocarde implique une consommation d'oxygène deux fois plus importante que celle liée au métabolisme des hydrates de carbone. GORDON et CHERKES (61) ont pu montrer le rôle important de la fraction non-estérifiée des acides gras dans cette utilisation des lipides.

L'étude de la variation du quotient respiratoire montre qu'il passe de 1,0 à 0,7 témoignant ainsi du passage d'une extraction préférentielle du glucose à une consommation de lipides en période de jeûne.

Malgré leur faible importance, à l'état normal, moins de 5 p. 100 dans l'utilisation myocardique de l'oxygène, les corps cétoniques peuvent jouer un certain rôle dans le métabolisme du myocarde puisque leur utilisation est commandée par leur taux artériel ainsi que par celui de la glycémie.

Contrairement aux notions recueillies sur des préparations coeur-poumons, les recherches de BING montrent que le coeur humain comme celui du Chien peut extraire les aminoacides (21). Après une perfusion d'acides aminés, le pourcentage de consommation d'oxygène lié à l'utilisation de ces derniers passe de 5,6 à 40 p. 100.

Devant la pluralité des substrats métabolisables, BING a pu écrire que "cette grande souplesse peut être considérée comme un grand facteur de sécurité."

Une autre particularité métabolique mérite d'être soulignée. FLEKENSTEIN (57), avec du P radioactif, montre que l'introduction du phosphore inorganique dans les liaisons hautement énergétiques se fait environ vingt fois plus vite dans le myocarde que dans un autre muscle. La rapidité de cette incorporation peut varier dans des proportions considérables (de 0 à 100), dépendant de la température et des variations métaboliques, mais non de l'activité mécanique.

PARTICULARITES METABOLIQUES DU COEUR NORMOTHERMIQUE
EN FIBRILLATION VENTRICULAIRE

La perfusion du coeur de Chien en fibrillation ventriculaire provoquée, permet à BING (18) l'étude de sa consommation d'oxygène. Il constate que celle-ci augmente faiblement dans la première heure qui suit l'arrêt cardiaque. Elle diminue ensuite progressivement pour s'arrêter au bout de quatre heures. Pendant ce même laps de temps, l'extraction du glucose baisse de 22 p. 100, comme celle du lactate et des acides aminés.

Plus récemment, BING (31) a montré une augmentation de l'activité de certains enzymes : phosphorylase, glucose-6-phosphatase. Mais la réserve myocardique de glycogène s'abaisse.

Ces troubles, témoins d'assez grands délabrements métaboliques, paraissent surtout liés à un état d'anoxie dont est responsable la mauvaise irrigation myocardique.

CHAPITRE III

Modifications apportées par l'hypothermie dans les échanges gazeux et l'équilibre acide-base du sang

Des changements physicochimiques apportés par l'hypothermie, le plus important est peut-être celui qui concerne l'état des gaz du sang. Les gaz, suivant la loi de HENRY, deviennent plus solubles dans un fluide qui se refroidit. A côté de cette modification de nature physique, deux autres phénomènes, induits par l'hypothermie, interviennent pour influencer l'état des gaz du sang :

— les mouvements respiratoires spontanés s'affaiblissent pour s'arrêter vers 27° , imposant alors la mise en place d'une respiration assistée d'autant plus nécessaire que bien souvent une thoracotomie supprime l'efficacité des mouvements respiratoires autonomes;

— de plus le ralentissement cardiaque, la baisse de la pression artérielle et celle du débit sanguin amenuisent le transport des gaz entre le poumon et les autres tissus.

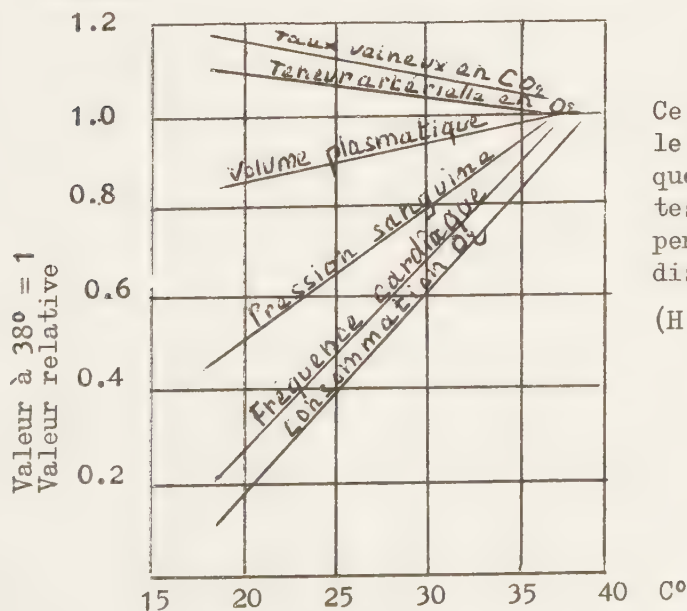


Fig.1

Ce schéma montre le comportement de quelques constantes physiologiques pendant le refroidissement du corps

(H. HENSEL)

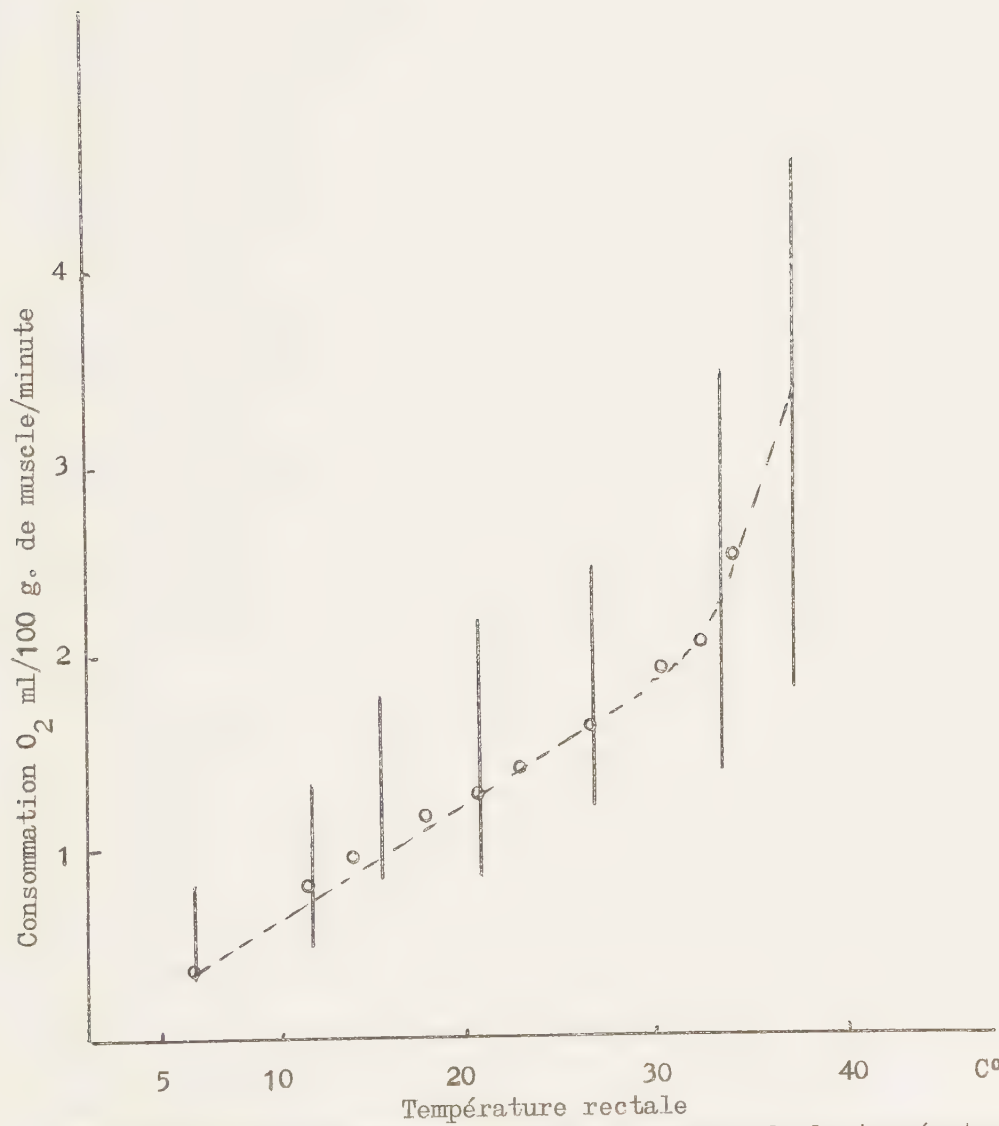
L'intérêt pratique de l'hypothermie réside dans la réduction de la consommation d'oxygène qui l'accompagne. En ce qui concerne le coeur, les mesures de PENROD (123, 124), BIGELOW (10, 11), JUVENELLE (78, 79), tendent à prouver que la consommation d'oxygène à 20° est réduite à 15 p. 100 de la consommation normale. Dans ces conditions il semble que le coeur ne contracte pas de dette d'oxygène en dépit d'une circulation très lente (BIGELOW (12,13), JUDE (77), BING (19). L'analyse des gaz du sang apporte à PENROD et ROSENHAIN (125) la preuve que l'hypoxie n'existe pas malgré un déplacement de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (DILL et FORBES (51)), car la solubilité de l'oxygène dans le plasma augmente de 50 p. 100 en descendant de 38° à 20°.

Cependant, des auteurs comme HEGNAUER (68), SWANN (155, 156, 159), RAMOS (130) admettent l'éventualité d'une hypoxie tissulaire. Malgré la chute de la consommation d'oxygène, malgré la persistance d'une différence de concentration artério-veineuse, malgré une augmentation de la solubilité de l'oxygène à froid, cette éventualité ne peut être rejetée en raison d'une dépression des systèmes enzymatiques utilisant l'oxygène ou des perturbations apportées à l'équilibre acido-basique par l'effet conjugué de la ventilation assistée et de l'hypothermie.

La réduction de cette consommation d'oxygène subit des variations individuelles assez importantes, ainsi que le rapporte un travail de GREENBERG (65) - figure 2 -

De plus des moyennes de consommation d'oxygène, avant hypothermie, pendant le refroidissement à 10° et après le retour à la température normale, objectivent une consommation plus élevées après réchauffement, pouvant être interprétée comme le témoin d'une certaine dette d'oxygène. (Figure 3, page 24)

L'hypothermie d'autre part peut intervenir sur l'équilibre acide-base du milieu intérieur, par la nécessité de la ventilation assistée et par des changements des caractéristiques physicochimiques des cellules et des liquides extracellulaires. Du fait de la réduction des métabolismes créée par l'hypothermie, la production du gaz carbonique est réduite.



Consommation du coeur en oxygène en fonction de la température
(chaque point est la moyenne de 12 expérimentations).

Fig. 2

extrait de "Myocardial Metabolism" de J.G. Greenberg

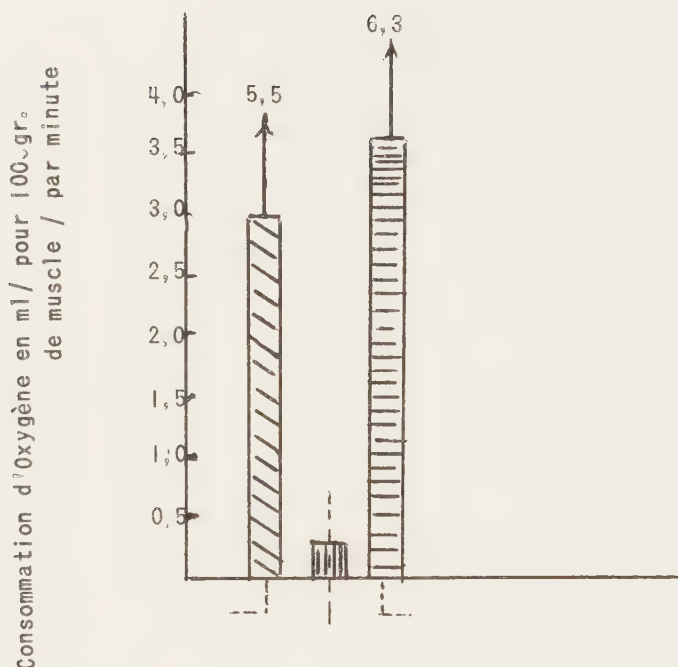


Fig. 3

Consommation d'oxygène par le myocarde
(de gauche à droite)

- à 38° avant hypothermie
- vers 10°, le coeur étant arrêté par l'hypothermie
- après réchauffement à 38° et reprise d'une activité contractile normale.

(moyenne de 12 expérimentations)

Extrait de "Myocardial Metabolism" de J.G. GREENBERG

L'échange entre le gaz carbonique du sang veineux de retour, au niveau des alvéoles pulmonaires et le gaz carbonique de l'air alvéolaire est réglé à la fois par la tension du gaz carbonique de l'air alvéolaire P_{ACO_2} et celle du sang P_{vCO_2} .

En normothermie, ces deux tensions sont en équilibre, à 40 mmHg, lorsque le sang s'est artérialisé.

La PCO_2 de l'air alvéolaire risque d'être perturbée, en dehors de toute hypothermie, par l'effet de la ventilation artificielle.

Dans le cas du sang, la PCO_2 est liée à la fois à la solubilité du gaz carbonique dans le plasma, aux systèmes tampons du sang, en particulier au système bicarbonate-acide carbonique.

L'équation d'HASSELBALCH-HENDERSON permet de réunir ces données :

$$pH = pK' + \log \frac{[B.HCO]}{[H.HCO]}$$

pK' est une constante de la somme qui inclue la première constante de dissociation de l'acide carbonique, le degré de dissociation de la molécule de bicarbonate et l'hypothèse que la concentration totale de l'acide carbonique puisse être utilisée pour l'acide non dissocié (ROBINSON et CULLEN (133)).

La valeur de pK' à 37° , dans les limites normales de pH est : 6,10.

Mais cette constante est dépendante de la température, ainsi que l'ont établi ROSENHAIN et PENROD (125).

$$\begin{aligned} 38^\circ &= 6,10 \\ 35^\circ &= 6,115 \\ 30^\circ &= 6,14 \\ 25^\circ &= 6,165 \\ 20^\circ &= 6,19 \end{aligned}$$

Du fait de la corrélation entre pK' et pH, SEVERINGHAUS (143, 144, 145) a construit une abaque permettant de connaître la valeur de pK' en fonction du pH et de la température.

On doit à VAN SLYKE (149) la démonstration de la présence de l'acide carbonique dans les fluides corporels à une concentration telle qu'il convertit automatiquement en bicarbonate toutes les bases qui ne sont pas liées aux autres acides; dans les conditions normales de l'équilibre acide-base, il a pu montrer :

$$\frac{CO_3 \text{ H.B}}{CO_3 \text{ H}_2} = \frac{20}{1}$$

C'est ce qui permet d'écrire sous une autre forme l'équation d'Hasselbalch-Henderson (VAN SLYKE (150, 151, 152, 153)).

$$\text{pH} = 6,10 + \log \frac{\left[\text{total CO}_2 \right] - 0,0301 P_{\text{CO}_2}}{0,0301 P_{\text{CO}_2}}$$

P = tension du CO_2 en mm Hg

$0,0301 = \text{CO}_2$ dissous en mM/l sérum

pour $P_{\text{CO}_2} = 1$ mm Hg

Ce facteur de solubilité ($0,0301$), s selon SEVERINGHAUS est calculé de la façon suivante :

$$s = \frac{\text{CO}_2 \text{H}_2 \text{ (mM/l)}}{P_{\text{CO}_2} \text{ (mm Hg)}}$$

Or ce coefficient s est sous la dépendance de la température :

38°	$= 0,0301$
37°	$= 0,0308$
30°	$= 0,0362$
28°	$= 0,0381$
26°	$= 0,0402$
24°	$= 0,0425$
22°	$= 0,0450$
20°	$= 0,0478$

Ainsi chacun des deux termes de l'équation d'HENDERSON-HASSELBALCH est fonction de la température.

Il en est de même pour le pH, qu'on exprime à partir de la constante de dissociation de l'eau; or celle-ci varie aussi avec la température :

c'est à 22° que $C [\text{H}^+] = C [\text{OH}^-] = 10^{-7}$ et $\text{pH} = 7$

mais à 38° $C [\text{H}^+] = C [\text{OH}^-] = 10^{-6,80}$ et $\text{pH} = 6,80$

tandis que 0° $C [\text{H}^+] = C [\text{OH}^-] = 10^{-7,50}$ et $\text{pH} = 7,50$

C'est pour corriger ces différences dues au facteur température que ROSENTHAL (135) a proposé un coefficient, seulement valable in vitro, permettant de rapporter à la température de 38° , le pH mesuré à la température t du laboratoire : en effet le pH d'un sang, conservé en anaérobiose, mesuré à 18° et trouvé égal à 7,694 correspond, en fait, à 38° à un pH de 7,40. Plus récemment GRAIG (63) a proposé un nouveau coefficient, peu différent du précédent.

En tenant compte de la différence entre la neutralité à 38° c'est-à-dire $\text{pH} = 6,80$ et du pH du sang qui, dans les conditions normales, est situé entre 7,35 et 7,45, on peut se demander ce que serait le pH d'un sang prélevé à 22° ? Pourrait-on écrire, en première approximation, que sa valeur se situe entre 7,55 et 7,65 ? Mais ceci n'est pas licite parce que le sang n'est pas constitué par un système tampon unique.

Il serait avantageux de connaître les limites entre lesquelles peut théoriquement varier le pH sanguin, en fonction de la température du sang. Il deviendrait alors possible de tracer des abaques. Celles proposées par VAN SLYKE (150, 153) permettant la détermination de la PCO_2 et définissant les zones d'acidose et d'alcalose ne sont valables que pour un sujet à 37° . Elles deviennent inapplicables en hypothermie. ROSENHAIN et PENROD (125) ont calculé la variation du CO_2 total contenu dans le plasma en fonction d'un abaissement de température tout en gardant une PCO_2 et le pH constants.

Ceci ne peut être défini par un point dans un plan puisqu'il y a trois variables : la température, le pK' et le volume de CO_2 .

T	pK'	pH	PCO_2 en mmHg	CO_2 en volume p.100
38°	6,10	7,38	40	44,5
35°	6,115	7,38	40	45,9
30°	6,14	7,38	40	46,4
25°	6,165	7,38	40	50,2
20°	6,19	7,38	40	55,2

Ce calcul est très artificiel. Dans le sang et dans le cas d'hypothermie en particulier, de telles conditions ne peuvent se rencontrer puisque toutes les variables

sont liées. Même en maintenant la P_{ACO_2} constante, la signification du pH perd beaucoup de sa valeur puisque pour un pH lui-même constant, on observe une augmentation du CO_2 total, rien que par abaissement de la température à laquelle est lié le pK' .

L'augmentation des ions H ou de la P_{aCO_2} gêne la formation d'oxyhémoglobine : phénomène connu sous le nom d'effet BOHR. L'augmentation d'acidité du milieu ralentit la dissociation acide des groupes imidazoles de la globuline avec laquelle l'hème est lié et ceci à son tour diminue l'affinité de la ferro-hémoglobine pour l'oxygène. De ce fait pour une même P_{AO_2} , une augmentation de la P_{ACO_2} diminue la quantité d'oxyhémoglobine qui existe dans les globules rouges. Cependant le gaz carbonique peut réagir avec l'hémoglobine pour former des carbamino-composés qui sont plus facilement dissociables. Mais la quantité de CO_2 qui peut être combinée sous forme de carbaminoglobine, n'augmente pas de manière appréciable avec l'accroissement de la tension de CO_2 (WHITE, HANDLER et SMITH (165)).

Dans les conditions normothermiques, une augmentation de la P_{ACO_2} est préjudiciable au transfert de l'oxygène sur les globules rouges; mais comme l'hypothermie modifie dans un autre sens la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine, finalement la résultante de ces facteurs ne paraît pas préjudiciable à l'oxygénation tissulaire. En fait la solubilité de l'oxygène dans les liquides biologiques est accrue et c'est l'oxygène dissous qui est immédiatement utilisable pour l'oxygénation tissulaire.

Enfin, certains auteurs, comme OSBORN (119), admettent que l'hypothermie peut perturber l'élimination du gaz carbonique, notamment en raison d'une diminution de l'activité de l'anhydrase carbonique.

Ces quelques considérations théoriques vont nous permettre de mieux comprendre certaines observations rapportées dans la littérature.

Au cours de la respiration assistée, indispensable au-dessous de $30^\circ\text{--}28^\circ$, ou même dès la thoracotomie, les variations de la P_{ACO_2} , si celle-ci n'est pas contrôlée, peuvent modifier de manière très importante les con-

ditions de l'équilibre acide-base. D'autre part le chiffre trouvé pour la valeur du pH n'est pas significatif d'un état d'alcalose ou d'acidose puisque les mesures sont faites sur un sang refroidi dont les systèmes tampon ont des constantes de dissociation différentes de ce qu'elles étaient à 37°. D'UNE SIMPLE MESURE ELECTROMETRIQUE DE pH, ON NE PEUT CONCLURE A UN ETAT D'ALCALOSE OU D'ACIDOSE LORSQUE L'ORGANISME EST EN HYPOTHERMIE. Cette notion est importante car elle montre toute la difficulté qu'on éprouve à conduire la thérapeutique des troubles de l'équilibre acido-basique en hypothermie et d'autre part elle permet de comprendre pourquoi les résultats apportés par les différents expérimentateurs ont été en ce domaine assez discordants.

En effet BIGELOW (10, 11, 15) observe un état d'acidose qu'il entretient même par une ventilation assistée enrichie de 5 p. 100 de CO_2 . Mais nombreuses sont les observations rapportant un état d'acidose souvent précédé d'une certaine alcalose qui aurait pour effet de désorganiser les systèmes les systèmes tampons. (DILL et FORBES (51), BREWIN (34, 35, 36), AXELROD (2), DETERLING (48) BESSMANN (8) HENNEMAN (70), NIAZI et LEWIS (108)).

Des fluctuations dans le taux sanguin des lactates et citrates sont liées à ces états. Mais, pour BING (19), KUHNE et SCHREIER (85), HELLIG (69) le taux des acides fixes du sang ne subit pas de variations importantes.

Outre ces modifications physico-chimiques portant sur le milieu intérieur, l'hypothermie peut perturber les conditions de ventilation alvéolaire du fait des modifications du volume de l'espace mort par bronchoplégie. SEVERINGHAUS (142) estime que l'espace mort physiologique peut augmenter de 25 p. 100.

Mais de plus, l'autre système concourant au bon équilibre acido-basique de l'organisme est lui aussi soumis à l'hypothermie. L'appareil rénal est placé dans des conditions critiques liées à l'abaissement de la température et à la diminution du débit sanguin (BERGSTRAND et STERKY) (63), MAYER (100b), MORALES (104). Il ne pourra donc intervenir que médiocrement dans la correction des désordres créés du côté pulmonaire.

Puisque tous ces phénomènes, plus ou moins intriqués interviennent sur l'équilibre acide-base, comment alors envisager la surveillance des échanges gazeux au cours de l'hypothermie ? En dehors d'une oxygénation artérielle assez facile à obtenir, les conditions les moins pathologiques résident pour SEVERINGHAUS (146) dans le maintien d'une P_{aCO_2} entre 22,9 et 25 mmHg avec un pH semblable à celui d'un sang refroidi à la même température, in vitro, en anaérobiose.

En dehors de son influence sur l'équilibre acido-basique, d'autres manifestations ont pu être rapportées plus ou moins étroitement liées à l'hypothermie.

Parmi celles-ci certaines apportent quelques lueurs sur les éléments du métabolisme intermédiaire. Ces études ont porté sur des dosages d'ATP, ADP, AMP et P inorganique, acides lactique, pyruvique et α -cétoglutarique. Ces investigations ont eu lieu soit sur des coupes de ventricule gauche (HELLIG (69), LILLEHEI et GOTT (94)), soit sur du sang fémoral (KUHN et SCHREIER (85)). Dans tous les cas, il y a diminution du taux de l'ATP avec une augmentation des phosphates inorganiques et une bonne stabilité de la teneur en ADP. Mais au cours de ces expériences, plusieurs facteurs, étrangers à l'hypothermie, peuvent interférer avec elle et HELLIG constate, sur des données statistiques, qu'il est difficile de relier spécifiquement ces variations à l'hypothermie. Il n'en retient pas moins comme dépendant du refroidissement, un abaissement du taux de l'acide α -cétoglutarique.

CHAPITRE IV

La détermination chromatographique des acides organiques du cycle des acides tricarboxyliques

La recherche des acides organiques non aminés dans les milieux biologiques a déjà été réalisée grâce aux deux techniques chromatographiques souvent appliquées à de nombreux problèmes analytiques :

- par chromatographie sur colonne de gel de silice FROHMAN, ORTEN et SMITH (58, 59), DAJANI et ORTEN (45), BUSCH et HURLBERT (38), NAGUIB et BEERBOM (106).

- par chromatographie sur papier.

En ce dernier cas, la chromatographie a porté :

- soit sur des acides déjà isolés des milieux biologiques à l'état de 2,4 dinitrophenylhydrazones (EL HAWARY et THOMPSON (52), MC ARDLE (102), CAVALLINI et FRONTALI (39), KAESER et LESTRADET (82), ADLER (1), BIZERTE et DASSONVILLE (33)).

- soit sur des acides libres et reprenant des travaux de MUNIER et MACHEBOEUF (105), chromatographie directe de ces acides, deux techniques ont presque en même temps été publiées par OSTEUX et LATURAZE (120, 121, 122) et par NORDMANN et coll. (109, 110). Schématiquement les acides de l'urine désalifiée par passage à travers une colonne de résine échangeuse d'ions, sont élués par l'acide formique, évaporés, déposés sur une feuille de papier Whatman N° 1 et soumis à une chromatographie ascendante bidimensionnelle, avec un premier solvant alcalin et un deuxième acide.

Notre choix en faveur de la méthode proposée par NORDMANN et coll. a été guidé par plusieurs raisons :

- cette méthode avait été appliquée au sang (111, 112);

- la résine échangeuse d'ions, fortement basique, était indépendante du pH;

- l'élution n'était réalisée qu'avec une seule concentration d'acide formique.

Or nous avons eu de grandes difficultés et nous n'avons connu que des échecs lorsque nous avons voulu appliquer strictement la technique décrite par NORDMANN et ses collaborateurs. Certes, les résultats étaient satisfaisants lors des épreuves témoins, faites sur des acides organiques connus, mis en solution aqueuse, ce qui prouvait que la résine utilisée avait été convenablement choisie et que la migration des solvants se faisait dans de bonnes conditions. Mais il n'en était pas de même quand nous avons voulu passer à l'étude du sang. Il est en effet nécessaire dans ce cas d'éliminer les protéines, sinon celles-ci polluent la colonne de résine et les protéines restant après lavage même prolongé, forment avec l'acide formique d'élution et les grains de résine, un véritable "béton" à l'intérieur de la colonne, s'opposant totalement à toute élution.

Le protocole opératoire donné par NORDMANN est le suivant : "- 8 ml de plasma sont déprotéinisés par la chaleur après ajustement du pH à 5,3 par adjonction d'acide acétique (ce mode de déprotéinisation évitant l'introduction d'une substance gênant la chromatographie ultérieure). Après filtration et lavage des protéines, on passe les filtrats, puis 15 ml d'eau de lavage sur une colonne de Dowex..."

Certes, on trouvait cité en référence un travail de G. HUNTER (75) qui devait permettre de compléter ces indications un peu trop succinctes et qui, lorsque nous avons essayé de les appliquer sur le plan pratique se sont révélées tout à fait insuffisantes. Le premier problème que nous avons eu à résoudre a donc été celui de la déprotéinisation.

A -- LA DEPROTEINISATION DU PLASMA

1° -- Essai de déprotéinisation par la chaleur (dénaturation par un agent physique)

Nous avons étudié la précipitation des protéines plasmatiques en fonction de la dilution et de la température selon le schéma suivant :

Des échantillons de plasma, soit pur, soit dilués à 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10, 1/20, 1/25 et 1/50 sont, pour chacun d'entr'eux soumis à des températures progressivement croissantes entre 60° et 100° par paliers de 5°.

Nous n'avons pas dépassé la dilution au 1/50. Pour 8 ml de plasma, elle donne déjà 400 ml de filtrat à faire passer sur la colonne de résine, à la vitesse de 1 ml/minute !

Les dilutions sont faites avec de l'eau distillée, tout en sachant très bien que la coagulation des protéines ne se fait bien qu'en milieu suffisamment riche en électrolytes mais une dilution avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100 aurait apporté avec elle dans le cas

- d'une dilution au 1/10 : 0,72 g de ClNa

" 1/50 : 3,60 g de ClNa

dépassant de beaucoup la capacité de rétention de la colonne proposée.

Le plasma pur ou la dilution préparée sont amenés à pH = 5,3 par addition d'acide acétique au 1/10. La température à laquelle s'opère la dénaturation protéique, mesurée à l'intérieur du tube ou du ballon de verre contenant la dilution, est maintenue pendant 2 à 10 minutes, ce qui crée certainement des conditions favorables à la dégradation des acides organiques du sang et réduit peut-être de ce fait la valeur de la méthode.

Seule la dilution au 1/50 avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100, chauffée à 100°, pendant une dizaine de minutes, permet d'obtenir un filtrat absolument limpide, mais au prix d'une surcharge trop impor-

tante en anions Cl^- , pour la capacité de la colonne et la quantité d'anions organiques à retenir. Cette étude, maintes fois répétée, sur du plasma frais de bovin ou de Chien, a toujours conduit aux mêmes conclusions à l'issue de chaque série d'analyse. Il fallait donc envisager un autre mode de déprotéinisation.

2° - Essai de déprotéinisation par un acide ou un alcool (Dénaturation par un agent chimique)

On ne peut utiliser ni l'acide trichloracétique ou l'acide métaphosphorique qui sont retenus sur la résine, ni les hydrates de zinc ou de cadmium qui peuvent être salifiés et retenir des quantités plus ou moins importantes d'acides organiques.

Il est possible par contre d'éliminer les protéines plasmatiques par précipitation à l'alcool. Après quelques essais à l'alcool éthylique absolu, nous avons préféré nous servir d'alcool méthylique : ce dernier possède un point d'ébullition plus bas (68°) que celui de l'azeotrope de l'éthanol (79°) ; il est de plus, facile à obtenir et à conserver anhydre. Comme pour l'éthanol utilisé, le méthanol a préalablement été purifié (voir page).

Le plasma et le méthanol préalablement refroidis vers 0° sont mélangés dans un tube à centrifuger placé dans la glace, pour éviter l'échauffement provoqué par le mélange, échauffement éventuellement responsable d'altérations et d'une solubilisation plus importante de lipides. Après centrifugation, le surnageant est évaporé sous pression réduite (environ 18 à 20 mm Hg) dans un appareil à distiller. Le résidu est repris avec quelques millilitres d'eau distillée ou de solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100, puis la qualité de la déprotéinisation est testée par l'action d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. L'absence de floculation garantit une élimination totale des protéines plasmatiques. Le plan de travail est identique à celui mis en oeuvre dans l'étude de la coagulation à chaud.

Des échantillons de plasma amenés à pH 5,3, pH 6,5 et 7,6 par une solution au 1/10 d'acide acétique, sont ainsi dilués à 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10 et 1/15 avec le méthanol.

Il apparaît que les meilleures conditions, c'est-à-dire la plus petite quantité de méthanol nécessaire, correspondent à une dilution au 1/6, à pH = 5,3; le résidu d'évaporation, repris par une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100 ne précipite plus ni à la chaleur, ni avec l'acide trichloracétique à 20 p. 100.

Dans ces conditions, les acides organiques ne sont pas insolubilisés, ce qui aurait été surprenant puisqu'à l'état pur ils sont très solubles dans le méthanol et qu'à pH 5,3 ils ne sont plus salifiés. Ceci a été vérifié par des chromatographies de solutions d'acides organiques ayant subi ce traitement, en particulier les acides α -céto-glutarique, lactique, citrique, malique, succinique, aconitique et fumarique. Les chromatogrammes montrent que tous les acides sont retrouvés.

Ainsi du plasma traité à pH 5,3, par 5 volumes de méthanol, ne contient plus de protéines; le passage sur colonne et son élution par l'acide formique 12 N se produisent alors convenablement.

Des difficultés apparaissent cependant au moment du développement du chromatogramme. Celui-ci est entravé par la présence de lipides solubilisés par le méthanol, émulsifiés par l'eau distillée servant à reprendre le résidu d'évaporation, retenus de manière variable sur la colonne de résine et finalement élués par l'acide formique. Devant cette constatation, on peut admettre que le titre élevé du méthanol nécessaire à la coagulation des protéines, est responsable de cette solubilisation importante des lipides plasmatiques.

Un meilleur résultat a pu être obtenu par un essai de déprotéinisation en deux temps :

1° - coagulation de la plus grande partie des protéines par traitement du sang, à pH 5,3, avec un égal volume de méthanol, puis centrifugation et distillation sous vide du surnageant.

2° - reprise du résidu par 5 ml de méthanol, centrifugation et distillation sous vide.

La quantité de lipides résiduels est ainsi réduite, mais encore trop importante.

Nous avons alors envisagé l'extraction préférentielle des lipides, depuis le surnageant, avec l'éther de pétrole choisi pour ses propriétés solvantes particulières:

- 8 ml de plasma, à pH = 5,3, sont traités par 8 ml de méthanol refroidi dans la glace. Après centrifugation, extraction à deux reprises du surnageant trouble par 5 ml d'éther de pétrole décanté par centrifugation, la solution méthanolique est distillée sous vide. Le résidu repris par 5 ml de méthanol, centrifugé de nouveau, encore distillé sous vide, est passé sur la colonne de résine et finalement chromatographié sur papier. Ce traitement appliqué à des acides organiques témoins est responsable d'un appauvrissement déjà sensible; mais la présence de lipides, bien qu'en quantité réduite, perturbe encore la chromatographie, par formation de taches hétérogènes au cours de la migration des solvants.

De cette étude de la déprotéinisation du plasma, il résulte que le traitement à l'alcool méthylique absolu n'apporte pas la solution désirée. L'acétone n'a pas été utilisée à cause de la difficulté à l'obtenir pure, anhydre et de la conserver ainsi.

Au cours de ces essais, à la recherche d'un procédé de déprotéinisation satisfaisant, il a été fait appel à l'acide perchlorique. Les premières tentatives ont donné de mauvais résultats, sans doute en raison de la médiocre qualité de l'acide perchlorique employé. Par la suite, lorsque nous avons utilisé les procédés enzymatiques de dosage de certains acides organiques, ces essais ont été repris avec un nouveau lot d'acide perchlorique. Ils se sont révélés satisfaisants, non seulement pour le dosage enzymatique des acides α -cétoglutarique, pyruvique et lactique, mais encore pour la caractérisation chromatographique de ces éléments ou celle d'autres molécules provenant du métabolisme intermédiaire.

Le protocole opératoire est alors le suivant :

20 ml. de sang reçu sur héparine et fluoracétate de sodium sont immédiatement refroidi à 0°. On leur ajoute:

20 ml de solution diluée à 6 p 100 d'acide perchlorique (1), refroidi à 0°.

(1) Acide perchlorique Merck 70 % d=1,67

Le mélange avec un petit agitateur permet d'obtenir une sorte de pâte très homogène, toujours sous protection de glace.

Après centrifugation à 5.000 tours/minute, pendant 20 minutes, dans une centrifugeuse, refroidie par un serpentin avec circulation d'eau courante, on neutralise le surnageant avec une solution de potasse caustique 2N sous contrôle d'indicateur externe (colorant B.R.P. du Codex). Le perchlorate de potassium est éliminé en plaçant la fiole dans la glace pilée, pendant au moins dix minutes, puis par filtration rapide, à la trompe à eau, sur un filtre en verre fritté.

Une réacidification légère à l'acide formique, dilué au 1/10 permet d'éliminer un éventuel excès de potasse.

Après évaporation dans le vide, en présence d'acide sulfurique et de potasse en pastille, le résidu est repris par 2 ml d'eau bidistillée glacée, versé dans un tube à centrifuger entouré de glace, et centrifugé, dans les mêmes conditions, pendant 1 à 2 minutes à 5.000 tours/minute.

Le surnageant est prêt à passer sur la colonne de résine échangeuse d'ions. Il a été vérifié que la déprotéinisation est tout à fait satisfaisante.

3° - Déprotéinisation par dialyse

Puisque toutes ces tentatives de déprotéinisation chimique se soldaient par un échec, ou un insuccès relatif, il restait la dialyse capable de séparer ce que l'on peut toujours appeler les "cristalloïdes" et les "colloïdes", les petites molécules des acides organiques devant bien traverser la paroi du dialyseur.

Le choix du liquide de dialyse était cependant assez limité : il était impossible de se servir du polyvinyl-pyrrolidone (Substosan), car il aurait ensuite fallu s'en débarrasser; les électrolytes d'autre part n'étaient pas utilisables, car leurs anions auraient été retenus par la colonne de résine. Nous avons donc décidé de commencer cette étude avec de l'eau bidistillée, renouvelée assez fréquemment pour lutter contre l'équilibre tendant à se réaliser; puis nous avons envisagé de mener la

dialyse vis-à-vis de solution d'urée ou de glucose qui sont l'un et l'autre relativement inertes par rapport à la résine.

Les premières dialyses ont été réalisées avec des membranes de collodion, en forme de petits tubes de 50ml de capacité. Nous avons rencontré avec le collodion Codex les irrégularités dans la vitesse de diffusion et dans la perméabilité de la membrane qui ont déjà été signalées par RUITTON (137). De plus la dialyse est longue (minimum 6 heures) et la dégradation enzymatique se poursuit si bien qu'on ne retrouve pratiquement, dans le cas du sang ou d'acides témoins rajoutés, que de l'acide lactique, alors qu'en solution pure les acides témoins se retrouvent en totalité. L'installation du dialyseur à l'intérieur d'un réfrigérateur à la température de +3 à +4°, même en présence de fluorure de sodium à la concentration de 2 mg/ml ne suffit pas inhiber cette dégradation enzymatique.

De plus, il est difficile d'obtenir des membranes régulières car l'évaporation d'un des solvants du collodion (éther éthylique) sous forme de petites bulles, laisse une couche de collodion trop mince et parsemée de petits pertuis, si bien que souvent le dialysat est contaminé par une issue de matériel venu de l'intérieur du sac.

La cellophane offrait un matériel vraisemblablement plus utilisable et des essais ont été faits avec des boyaux de cellophane, du type employé dans les appareils d'épuration extra-rénale (reins artificiels). Ces dialyseurs certainement préférables à ceux utilisant le collodion sont solides, réguliers et la dialyse est plus rapide; le seul problème à résoudre paraissait n'être plus que celui de la dégradation enzymatique des éléments du sang, quand nous avons pu disposer d'un Auto-Analyseur - Technicon.

Cependant, telle qu'elle avait été réalisée, cette étude préliminaire de la dialyse n'avait pas été totalement inutile. Nous avons pu en particulier constater que dans les conditions de pH où elle s'opérait, les bicarbonates du plasma passent dans le dialysat. Au moment de l'éluion par l'acide formique, le gaz carbonique se dégage, bouleverse l'ordonnance de la colonne qui prend un aspect de mie de pain et l'éluion s'arrête. Il faut donc décomposer ces bicarbonates avant le passage du dialysat sur la colonne.

Dialyse du sang complet par l'Auto-Analyseur-Technicon

De tout l'ensemble des éléments composant cet appareil, nous avons utilisé la pompe proportionnante et le dialyseur, ce qui nous permet de substituer à la dialyse habituelle une "dialyse dynamique".

La dialyse est effectuée à travers une membrane de cellophane dont les pores ont une taille de 25 à 35 Angströms, placés entre deux disques de résine acrylique, dans lesquels sont creusés des sillons de 1,57 mm de largeur, de 0,78 mm de profondeur et environ 2,20 m de long. Le sang et le liquide de contre-dialyse sont pulsés par la pompe proportionnante qui, de plus, segmente ces veines liquides par des bulles d'air, assurant une circulation régulière, à l'abri des phénomènes de BERNOUILLI. Il s'agit d'une pompe à rouleaux écrasant des tubes de chlorure de polyvinyl (Tygon) : c'est le diamètre de ces tubes qui régit le débit.

L'appareil utilisé était muni de deux dialyseurs montés en série, le sang et le liquide de contre-dialyse circulant à contre-courant. Nous avons choisi le débit le plus faible pour le sang, afin de prolonger au maximum le temps de dialyse, mais pour éviter la formation d'un équilibre entre le sang et le liquide de contre-dialyse, le débit de ce dernier est supérieur à celui du sang. Nos "manifolds" étaient ainsi composés : (1)

sang	(tube noir-noir débit = 0,32 ml/minute (tube bulleur noir-noir
contre-dialyse	(tube orange-orange débit = 0,42 ml/minute (tube bulleur noir-noir

(1) Le calibre des tubes montés sur tous les Analyseurs Technicon est repéré par des bagues colorées selon un code qui est toujours le même pour tous les appareils.

	diamètre intérieur en millième de pouce	débit en ml/minute
ainsi tube noir-noir	0,030	0,32
orange-orange	0,035	0,42
.....		
rouge-rouge	0,045	0,80
.....		
violet-violet	0,081	2,5
.....		
violet-clair	0,110	3,90

le pouce = 2,54 cm

La vitesse de dialyse pour une membrane donnée dépend de plusieurs facteurs :

- milieu de contre-dialyse
- température ambiante
- agitation du dialysant et du dialysat
- nature et concentration de l'élément dialysant.

Dans le recueil de techniques accompagnant l'Auto-Analyseur, on peut trouver divers types de solution de contre-dialyse, mais chacune d'entre elles est étroitement adaptée à un dosage particulier. Il a donc fallu faire des essais et nous avons étudié l'influence de la concentration du liquide de contre-dialyse, sur le passage quantitatif de l'acide citrique. Ce choix se justifie car nous disposons d'une méthode de dosage satisfaisante, suffisamment sensible et parce que l'acide citrique fait partie des acides du cycle de KREBS dont il est même l'élément de poids moléculaire le plus élevé (P.M.= 192).

Nous avons utilisé l'eau distillée, des solutions isotoniques d'urée (1,80 p 100), de glucose (5 p 100). L'utilisation de ce dernier n'est d'ailleurs pas satisfaisante car on sait qu'il peut, dans certaines conditions, être transformé en acide lactique et retenu alors sur la résine. Les résultats montrent que ces solutions n'améliorent pas la dialyse de l'acide citrique et l'eau distillée convient même mieux !

A partir de cette notion, nous avons effectué des dialyses de sang hépariné, en dosant l'acide citrique du sang à l'entrée du dialyseur, celui contenu dans le sang effluent et l'acide citrique extrait par le liquide de contre-dialyse.

Dans une première série d'essais, le sang est laissé à son pH normal ou amené à pH = 5,3 en espérant ainsi libérer l'acide citrique de combinaisons insolubles. Dans ces conditions et en faisant deux dialyses itératives, on peut retrouver environ 30 pour cent de l'acide citrique total dans le liquide de contre-dialyse; ces résultats encourageants cependant, nous ont conduit à examiner de plus près les conditions de température et de pH du sang.

Si on veut faire jouer favorablement le système tampon du sang et libérer ces acides d'éventuelles combinaisons avec certaines bases, il faut alcaliniser au lieu d'acidifier. Dans une deuxième série d'essais, le pH du sang, contrôlé au pH-mètre, est amené à 9,2 par addition d'ammoniaque diluée au 1/10, à la température du laboratoire (18-20°). Au cours d'une seule dialyse la quantité d'acide citrique extraite se monte alors à 50 p 100 de la quantité totale.

A titre d'exemple, voici les résultats de l'essai du 10/2/62 :

	Volume	Acide citrique	
		μ g/ml	total μ g
Sang afférent au dialyseur	24 ml	40	960
dialysat	57 ml	6,7	491 (environ 50 %)
Sang effluent du dialyseur	25 ml	18,4	404 (environ 50 %)

Les résultats chromatographiques témoignent aussi de l'intérêt de ce changement de pH : les spots sont plus nombreux et plus intenses.

Nous avons maintenu une deuxième dialyse itérative moins riche cependant, mais qui améliore encore l'extraction de l'acide citrique.

La prolongation de ces dialyses (environ 3 heures pour un échantillon de sang de 20 ml.) conduit à examiner de plus près les conditions de dégradation enzymatique se poursuivant durant tout ce temps : nous avons choisi un compromis entre la vitesse de dialyse plus élevée à 37° accompagnée d'une activité enzymatique plus intense et une vitesse plus faible à 0° mais une activité enzymatique ralentie à cette température.

Aussi les opérations ont-elles été conduites à la température du laboratoire, voisine de 18°; mais le sang avant de passer dans les plateaux du dialyseur attend dans un ballon entouré de glace et est reçu à la sortie

du dialyseur, de nouveau dans la glace jusqu'à son 2e passage. La dégradation est ainsi bien diminuée, mais elle est encore importante comme le témoignent les spots d'acide lactique sur le chromatogramme.

Le sang était pourtant recueilli sur fluorure de sodium, mais cet inhibiteur se révèle insuffisant aux concentrations utilisées et on ne peut en mettre davantage sous peine de surcharger en anion fluorure, la colonne de résine échangeuse d'ions.

Le mono-iodacétate de sodium, à la concentration M/500, passe pour un excellent inhibiteur de la dégradation enzymatique des acides du cycle des acides tricarboxyliques. Il nous a donné des résultats bien supérieurs à ceux du fluorure de sodium; mais il est instable et se décomposait déjà au cours de l'évaporation du liquide riche en acide formique issu de l'élution de la résine échangeuse d'ions. De plus, sur les chromatogrammes, une grande traînée brune transversale suivait la migration du solvant acide. Cet inhibiteur ne convenait donc pas à ce genre de travail. Il fallait en essayer d'autres.

Le cyanure de potassium (l'ion CN^-) exerce aussi une action puissamment inhibitrice sur cette dégradation des acides et des sucres, action déjà importante à la concentration M/1000. Sur le plan pratique, il ne nous a pas donné satisfaction car l'ion CN^- retenu sur la colonne est déplacé par l'acide formique d'élution et son dégagement à l'état gazeux désorganise complètement la colonne; de plus nous avons observé la disparition des spots sur nos chromatographies, peut-être par suite de la formation de cyanhydrines ?

L'acide éthylène-diamine-tétracétique - EDTA - pouvait être utilisé en raison de son pouvoir complexant vis-à-vis de certains métaux co-enzymes. En ce cas il faut en calculer la concentration, afin de complexer d'abord tout le calcium présent dans le sang, avant d'inactiver les ions métalliques; c'est dire qu'il faut une quantité supérieure à 21 mg du sel disodique pour 20 ml de sang. Comme nous l'avons déjà souvent constaté l'anion de l'EDTA est retenu par la colonne de résine; mais il est élué et après évaporation, on le retrouve en quantité importante si bien que l'on aurait pu déposer des "écailles" d'anions EDTA sur la feuille du chroma-

togramme, la chromatographie perdant alors toute signification; cet agent se révèle donc, lui aussi, totalement inintéressant.

Enfin, avec l'emploi du fluoracétate de sodium (1) nous avons pu disposer d'un produit actif, stable et efficace à la concentration M/500 (0,1 mg/10 ml de sang), (BARTLETT (4)).

B - LA CHROMATOGRAPHIE DES METABOLITES

Le problème de la déprotéinisation étant résolu d'une manière à peu près satisfaisante, il était possible alors, de passer à l'étude analytique des acides du cycle tricarboxylique contenus dans le sang. La technique suivie (inspirée partiellement des travaux de NORDMANN) est alors la suivante :

1° - Prélèvement de sang et déprotéinisation

On prépare des ballons de verre Pyrex de 100 ml, contenant, pour un volume de sang d'environ 20-25ml, 0,2 mg de fluoracétate de sodium en solution dans l'eau, ainsi que 25 mg d'héparine; ce ballon est placé dans un récipient plein de glace pilée. Dès la réception du sang, le ballon est agité par un mouvement de rotation de façon à le refroidir et à le mélanger intimement au fluoracétate et à l'héparine; si le sang ne peut être mis rapidement en dialyse, on le congèle dans le réfrigérateur jusqu'à utilisation.

Avant la dialyse, le sang est décongelé, ramené à la température du laboratoire et transvasé dans un autre ballon en le filtrant sur une fine étamine de nylon. Ceci a pour but de retenir d'éventuels petits caillots qui, en

(1) Nous tenons à remercier la firme helvétique FLUKA, à BUCHS qui a mis gracieusement à notre disposition le fluoracétate de sodium que nous avons utilisé.

obstruant les sillons du dialyseur, provoqueraient une rupture de la membrane de cellophane. Il est même bon, à ce moment, de rajouter quelques milligrammes d'héparine.

Quand le sang est à la température du laboratoire, on l'amène à pH = 9,2 par addition d'ammoniaque diluée au 1/10, avec contrôle au pH-mètre. Sitôt cette alcalinisation effectuée, le ballon contenant le sang est placé dans la glace qui est renouvelée jusqu'à la fin de la dialyse; on place aussi un autre ballon dans la glace pour recevoir le sang effluent en attendant la deuxième dialyse.

La pompe, équipée des tubulures précédemment décrites, alimente le dialyseur muni de ses deux plateaux placés en série avec une circulation à contre-courant. La dialyse s'effectue à la température du laboratoire.

Après chaque dialyse, l'ensemble de l'appareil est remis dans un état de grande propreté par lavage avec une solution détergente essentiellement constituée de phosphate trisodique suivie d'un rinçage abondant à l'eau distillée.

2° - Désalification sur résine

Selon les données de NORDMANN, des colonnes à chromatographie (longueur utile = 120 mm, diamètre intérieur = 6 mm) munies d'un robinet à leur extrémité inférieure, sont remplies de résine échangeuse d'ions (résine Dowex 2 80 à 60 meshs, de qualité analytique). La résine doit d'abord séjourner dans l'eau distillée. Elle s'hydrate et augmente de volume. Dans le cas où ce gonflement se produirait dans la colonne, le passage des liquides à travers celle-ci deviendrait impossible, la résine étant trop tassée. Elle est ensuite lavée selon les indications de SAMUELSON (139) : à quatre reprises, on renouvelle l'opération suivante :

- 10 ml d'acide chlorhydrique N
- 50 ml d'eau distillée
- 10 ml de soude N/2
- 50 ml d'eau distillée.

On transfère la résine dans le cycle formiate en faisant passer :

40 ml de formiate de soude M 6,80 g p 100

puis

200 ml d'eau distillée.

Ayant observé une coloration de l'éluat au cours de la première élution, nous avons jugé bon de traiter la colonne ainsi préparée, par un lavage à l'acide formique 12 N, afin d'éliminer des matières étrangères qui auraient pu accompagner la première élution de la colonne. Le processus est identique à celui utilisé pour l'élution des acides organiques fixés sur la colonne.

Le dialysat issu de l'Auto-Analyseur est légèrement alcalin. Il est alors acidifié par de l'acide formique dilué au 1/10 sous contrôle d'un indicateur externe (colorant B.R.P. du Codex); l'acide formique est un acide suffisamment fort pour décomposer les bicarbonates dont on est ainsi débarrassé. Le passage du dialysat sur la colonne est effectué selon un débit de 1 ml à la minute.

On lave ensuite la colonne avec 15 ml d'eau bidistillée fraîche; elle ne contient que peu de gaz en solution.

On élue ensuite les anions en presque totalité sauf une partie des chlorures, par 10 ml d'acide formique 12 N.

L'éluat est ensuite évaporé dans une cloche à vide, sous 20 mm Hg d'abord pour éviter un dégagement tumultueux d'acide formique accompagné de projections; la cloche à vide contient des cristallisoirs d'acide sulfurique et de potasse en pastille, cette dernière destinée surtout à fixer l'acide formique volatil. Il est important de changer chaque fois la potasse et peut-être moins souvent l'acide sulfurique. Mais ce dernier se charge en acide formique, qui se transforme lentement en oxyde de carbone et se dégage lors de la réalisation d'un vide ultérieur, rendant extrêmement longue l'évaporation de l'acide formique de l'éluat suivant.

Nous avons préféré cette technique à celle qui était décrite par NORDMANN (évaporation à l'air libre au bain-marie à 40°) pour assurer une meilleure conservation des acides organiques et éviter de répandre les vapeurs corrosives de l'acide formique.

3° Régénération de la résine

La quantité de résine contenue dans chaque colonne est prévue par NORDMANN pour garder une efficacité sa-

insaisissante, valable pour le traitement de deux échantillons de sang.

Cependant pour éviter certaines surcharges et d'éventuels mélanges, elles sont régénérées après chaque élution. On fait donc successivement passer :

- 30 ml de formiate de soude 3 M
- 100 ml d'eau distillée

et, pour chasser les anions Cl^- restant,

- 20 ml d'acide formique 12 N
- 50 ml d'eau distillée.

4° - Chromatographie sur papier

Le résidu d'évaporation de l'éluat est soumis à une chromatographie bidimensionnelle sur papier, avec un premier solvant alcalin, entièrement volatil, puis, après évaporation, avec un deuxième solvant acide, lui aussi entièrement volatil.

La composition du solvant alcalin est la suivante :

Ethanol absolu	85 v
Eau distillée	15 v
Ammoniaque 22° Baumé	5 v

Il est difficile de pouvoir disposer d'assez grandes quantités d'alcool absolu suffisamment pur, pour usage chromatographique. Il nous a paru opportun de déterminer le titre alcoolique de la solution obtenue par le mélange de l'éthanol et de l'eau, puis ensuite de préparer un alcool purifié de titre un peu plus faible, qui sera moins dilué, mais aura cependant le titre convenable.

Selon les tables d'alcoométrie du Codex, 85 ml d'éthanol absolu égalent 67,41 g d'éthanol. Dans la solution nous avons donc :

alcool absolu	67,41 g
eau	<u>15</u>
	82,41 g

le titre pondéral de cette solution est 82,41 mais il correspond en degré alcoométrique à un titre de 87°.

Il suffit donc de préparer le solvant selon la formule :

(alcool à 87°	82,41 g
) ammoniaque 22° Baumé	5 ml

L'alcool à notre disposition, stocké avant distribution en bidons métalliques, est chargé en ions métalliques, en aldéhydes et en produits de réactions secondaires. Il est préalablement traité par ébullition à reflux avec 1 p 100 de potasse en pastille, pendant 3 heures, puis soumis à une rectification à la colonne de Vigreux. Le titre alcoolique est déterminé par densimétrie et on prépare ensuite l'alcool à 87° avec de l'eau bidistillée. Ce solvant de chromatographie peut être préparé peu de temps avant son utilisation.

Il n'en est pas de même pour le solvant acide qui doit être préparé au moins 48 heures à l'avance. Sa composition est la suivante :

Propanol normal	50 v
Eucalyptol (Codex)	50 v
Acide formique	20 v
Eau distillée	q.s.p. le premier trouble

Les conditions de stockage du propanol, semblables à celles de l'éthanol, lui ont fait appliquer le même traitement à la potasse et une rectification, en ne recueillant que la fraction qui distille à 97°.

Une fois le mélange des trois premiers constituants effectué dans un flacon à bouchon de verre, on ajoute de l'eau bidistillée par petites quantités, de l'ordre de 2 à 3 ml à la fois, et on ne passe à une addition suivante qu'après une vigoureuse agitation. Dès qu'un trouble persistant apparaît, le solvant est transvasé dans une ampoule à décantation placée dans le local où se fera la chromatographie.

Il est souhaitable d'avoir un local où les variations thermiques soient aussi faibles que possible; nous n'avons pas pu maintenir à toutes les saisons la même température, mais les variations thermiques observées pour des périodes de trois à quatre jours n'ont jamais dépassé 1°, ainsi qu'en témoignait un thermomètre à

maxima et minima. Cette grande régularité thermique est surtout nécessaire pour le solvant acide qui se sépare, assez facilement, en deux phases.

Les chromatographies ont été menées en cuves, type Lederer-Jouan, pouvant contenir six chromatogrammes en méthode ascendante, grâce à un petit artifice : deux tiges de verre, horizontales, sont suspendues par du fil d'acier inoxydable, à 7-8 cm du bord supérieur des petites faces de la cuve. Sur ces tiges de verre, on pose de grandes baguettes de verre auxquelles sont suspendues les feuilles de papier Whatman N° 1.

La saturation de la cuve est obtenue par le séjour permanent d'une feuille de papier de même dimension que les chromatogrammes dont la base baigne constamment dans le liquide approprié : solvant alcalin pour la première dimension et phase aqueuse inférieure, décantée après séparation des deux phases du solvant acide, pour la seconde.

Après évaporation sous vide, le résidu de l'élution est repris en deux fois avec une goutte d'eau, puis une à deux gouttes d'alcool à 95° purifié. Ces solutions sont déposées sur une feuille de papier Whatman N° 1, de 46 x 46 cm sur lesquelles on a tracé deux marges perpendiculaires de 5 cm, à l'intersection desquelles on dépose le matériel à chromatographier. L'évaporation est faite sous un courant d'azote réchauffé à 30-35° si bien que le temps nécessaire pour déposer cette quantité relativement élevée de liquide n'est pas trop long.

Les feuilles de papier sont placées dans les cuves environ quatre heures avant la chromatographie, afin de réaliser une bonne saturation.

La durée de migration de chaque solvant est de 18 heures.

Après chaque solvant, le chromatogramme doit être ventilé énergiquement sinon les traces d'ammoniaque restant après la première migration, laisseraient une feuille légèrement alcaline, même après le passage du deuxième solvant acide. Ceci rendrait vaine toute tentative de révélation des spots acides. Après la seconde migration, une imprégnation trop importante à l'acide formique rendrait très difficile l'usage des indicateurs colorés.

Nous avons donc substitué à une "atmosphère ventilée", une ventilation très énergique en fixant les chromatogrammes sur un cadre maintenant les feuilles de papier dans le flux d'un important courant d'air (500 l/seconde) de 60 x 60 cm de section. Cette ventilation est poursuivie pendant 4 heures après la première dimension et 3 heures pour la deuxième.

5° - Identification des spots

Dans les mêmes conditions, nous avons chromatographié des acides témoins et nous avons mis à profit les données publiées par NORDMANN (109), SCHNEIDER et LACOSTE (140). Les spots sont révélés par le vert de bromocrésol en solution alcoolique et identifiés par leur Rf. Cependant ils n'ont pas tout été identifiés.

Nous nous sommes refusés à une interprétation quantitative car les méthodes proposées sont trop infidèles: planimétrie des spots, extraction et colorimétrie de l'indicateur coloré ou d'une réaction colorée donnée par l'acide isolé, extraction et acidimétrie combien sujette à erreur par suite d'une évaporation insuffisante de l'acide formique du solvant acide ! Peut-être la construction de colorimètres conçus pour l'usage chromatographique permettra-t-elle un jour de résoudre le problème !

C'est pourquoi à la suite de ces essais de séparations chromatographiques, avons-nous entrepris de doser individuellement certains acides, par des méthodes chimiques ou biochimiques éprouvées.

CHAPITRE V

Dosage de quelques acides du cycle de Krebs

Le dosage des acides pyruvique, lactique et α -céto-glutarique a déjà été l'objet de nombreuses recherches. Ces acides sont issus soit du métabolisme anaéro-bique des sucres dans le cas de l'acide pyruvique et lactique et peuvent intervenir dans la régulation de l'équilibre acide-base, soit du cycle métabolique de KREBS dans le cas de l'acide α -céto-glutarique et citrique.

A - DOSAGE DES ACIDES PYRUVIQUE, LACTIQUE et α -CETO-GLUTARIQUE

De toutes les techniques proposées pour le dosage de l'acide lactique dans les milieux biologiques, la méthode de BARKER et SUMMERSON (3), fondée sur une réaction décrite par DENIGES était jusqu'à ces dernières années la méthode la plus valable et est encore actuellement très souvent utilisée.

La majeure partie des travaux relatifs au dosage de l'acide pyruvique et α -céto-glutarique, repose sur la méthode de dosage proposée par FRIEDMANN et HAUGEN (55, 56). Ces acides sont isolés des liquides biologiques à l'état de 2,4-dinitrophénylhydrazones qui sont ensuite purifiées par lavage et finalement estimées par colorimétrie. Des améliorations ont été apportées par purification à l'aide de solvants par CAVALLINI et FRONTALI (39, 40), LESTRADET (82), EL HAWARY et THOMPSON (52) ainsi que par KUN et GARCIA-HERNANDEZ (87); la chromatographie sur papier a été appliquée à cette purification des hydrazones par Mc ARDLE (102) ainsi que par BUEDING (37).

A ces méthodes d'exécution complexe et longue, mais cependant indispensable pour l'obtention de résultats spécifiques et reproductibles, nous avons préféré choisir de nouvelles méthodes fondées sur les tests optiques de WARBURG. Ces méthodes enzymatiques mettent à profit la transformation physico-chimique du disphosphopyridine-nucléotide (DPN) engagé dans ces réactions.

D'une manière générale le DPN est engagé dans une réaction enzymatique réunissant l'acide à doser, un enzyme et ce DPN. Selon le cas, le DPN sera réduit ou oxydé et c'est ce changement de structure que l'on suit au spectrophotomètre en lumière ultra-violette : en effet le DPN réduit (DPNH) possède un très important coefficient d'absorption, maximum à 340 millimicrons, et ce "pic" est presque totalement supprimé pour le DPN oxydé (DPN). On mesurera donc, dans le cas des réactions où le DPNH passe de l'état réduit à l'état oxydé, la diminution de la densité optique à 340 millimicrons : ce type de dosage est appliqué au dosage de l'acide pyruvique et α -céto-glutarique; mais dans le cas du dosage de l'acide lactique, le DPN passera de l'état oxydé à l'état réduit (DPNH), car il est engagé dans une réaction qui se passe dans le sens opposé aux précédentes.

Ces méthodes de dosage, de principe simple et d'exécution relativement rapide, ont de plus, pour elles, une spécificité que n'a aucune des autres méthodes habituelles. Elles sont d'autre part faciles à mettre en oeuvre, grâce à la préparation, réalisée au niveau industriel, des substrats et des solutions enzymatiques qui allient à une grande activité une bonne stabilité : c'est le cas des coffrets de dosage de ces acides, préparés par la firme BOEHRINGER de MANNHEIM.

Cependant il est indispensable d'avoir à sa disposition un spectrophotomètre assuré d'une grande stabilité électrique, permettant d'isoler une bande étroite du spectre de l'hydrogène à 340 millimicrons. Nous avons utilisé le Spectrophotomètre électronique de JOBIN et YVON, équipé de sa lampe à Hydrogène, stabilisée et ventilée; les cuves utilisées sont en silice ou en verre Pyrex déjà suffisamment transparent à cette longueur d'onde. Le compartiment de mesure est thermostatisé par un dispositif à flasques avec circulation d'eau chaude à 25°, assurée par un Ultra-Thermostat ZEISS.

La très forte absorption lumineuse du DPNH à 340 millimicrons, nous prive du moyen habituellement utilisé pour contrôler la stabilité de l'ensemble de l'appareillage : une cuve identique à celle du dosage remplie de tous les éléments de la réaction sauf un. Il est dans notre cas impossible de savoir si les conditions n'ont pas changé entre la première et la deuxième détermination de densité optique. C'est pourquoi nous avons été amené(41) à faire réaliser un "témoin mécanique" de densité optique dont le principe repose sur la manoeuvre d'un volet à commande extérieure : après avoir réglé la densité optique de l'échantillon à doser - fixée arbitrairement à 0,5 -, on agit sur ce volet pour lui faire donner la même densité optique (0,5) sur l'échelle mobile du galvanomètre; lors de la deuxième mesure - de 2 à 4 minutes après la première dans le cas de l'acide pyruvique et α -céto-glutarique - on pourra s'assurer de la parfaite stabilité de l'ensemble électromécanique de tout l'appareillage et au besoin corriger un éventuel déplacement afin de retrouver les mêmes conditions que lors de la première mesure. (1)

La grande sensibilité de ces réactions enzymatiques, ainsi que le principe des mesures en lumière ultra-violette nous a conduit à prendre certaines précautions vis à vis des réactifs et du matériel mis en oeuvre :

a) l'utilisation d'un inhibiteur d'enzymes au cours de ce travail nécessite la sélection d'un matériel spécial tenu, avec la plus grande rigueur, à l'abri de toute contamination due au fluoracétate, sinon des résultats erronés par défaut seraient facilement obtenus;

b) toute l'eau utilisée est de l'eau soigneusement bidistillée, afin d'éviter toutes traces métalliques ainsi que l'emploi de résines échangeuses d'ions susceptibles de souiller l'eau soit par des traces de résines, soit par des substances qui n'auraient pas été retenues par ces résines;

c) c'est pour la même raison que doit être éliminé le matériel en polyéthylène ou autres matières plastiques capables de céder au liquide en contact certains agents fluorescents, opaques à la lumière ultra-violette ou modificateurs des réactions enzymatiques;

d) la déprotéinisation initiale à l'acide perchlo-

(1) Que M. Girard veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude pour la réalisation de cet appareil.

rique dilué doit être satisfaisante. Des nombreux acides perchloriques utilisés, seul l'acide perchlorique Merck à 70 p 100 ($d = 1,67$) garanti pur, nous a donné pleine satisfaction de manière régulière. La solution diluée à 6 p 100 (p/v) doit être extemporanément préparée avec de l'eau bidistillée pure et refroidie dans la glace. Elle doit être conservée dans un flacon muni d'un bouchon de verre, maintenu dans la glace.

e) il est indispensable de rincer parfaitement la cuve de mesure après chaque dosage, sinon la transformation du DPNH peut être amorcée par les traces d'enzymes laissées par la détermination précédente.

La technique de prélèvement et le traitement du sang ont déjà été indiqués (p.). Il est cependant recommandé et ceci est surtout valable pour le dosage des acides lactique et pyruvique, de ne pas attendre plus de deux heures avant de commencer les dosages, car le milieu a tendance à s'enrichir progressivement en ces deux acides. Enfin, l'élimination de l'acide perchlorique se réalise ici par des tampons phosphates et du fait des quantités plus faibles mises en oeuvre, il est préférable d'éliminer le perchlorate de potassium par centrifugation très rapide mais brève, limitant ainsi sa redissolution.

Puisque dans tous les dosages, la déprotéinisation est identique, on ne traite qu'un seul prélèvement de sang de 10 ml.

Les méthodes suivies pour ces dosages ont déjà fait l'objet de nombreuses publications surtout outre-Rhin : PFLEIDERER (127), BAUER (5), SEITZ (141), HORN et AMELUNG (74), HELBIG (69). Dans ces publications, les détails techniques sont quelquefois différents et c'est pourquoi nous avons suivi les méthodes proposées et standardisées par la Firme BOEHRINGER.

1° - Dosage de l'acide pyruvique dans le sang

L'acide pyruvique sanguin est transformé en acide lactique sous l'action de la lactico-déshydrogénase (LDH) et au cours de cette réaction le DPNH est oxydé en DPN : il y aura donc diminution de la densité optique à 340 millimicrons. L'étude de la réaction montre qu'il faut une molécule de DPNH par molécule d'acide pyruvique.

Technique

Dans un tube à centrifuger entouré de glace pilée, mesurer 4 ml de sang prélevé sans garrot,

+ 4 ml de solution diluée à 6 % d'acide perchlorique conservé dans la glace,

Mélanger très soigneusement avec un petit agitateur en verre, pendant au moins 5 minutes.

Centrifuger à 5.000 tours/minute pendant 20 minutes
Mesurer dans un tube à centrifuger parfaitement propre 3 ml de surnageant

+ 1 ml de solution de tampon (solution de phosphate dipotassique 1,1 M.)

Mélanger très soigneusement avec un agitateur en verre effilé, attendre 10 minutes en laissant le tube dans la glace afin de précipiter l'excès d'acide perchlorique à l'état de sel de potassium très peu soluble dans l'eau froide.

Centrifuger ce tube pendant 1 à 2 minutes à 5.000 tours. Cette technique est préférable à la simple décan-tation qui risque d'entraîner un peu de perchlorate. Le liquide surnageant, prélevé par aspiration, est ramené à la température de 25° et son pH se situe entre 6 et 7.

Dans la cuve de 10 mm d'épaisseur du spectrophotomètre, pipeter dans l'ordre suivant :

2 ml de surnageant
+ 0,05 ml de solution de DPNH

Mélanger avec un agitateur à bord mousse.

Placer la cuve dans le compartiment de mesure du spectrophotomètre et amener arbitrairement la graduation de l'échelle mobile du galvanomètre à $D.O. = 0,5(D.O.o)$ à la longueur d'onde 340 millimicrons.

A l'aide du témoin mécanique, retrouver cette densité optique, s'assurer par un nouveau contrôle que la densité optique de la cuve de mesure n'a pas varié, sinon la replacer à $D.O. = 0,5$.

En même temps qu'on déclanche un chronomètre, introduire dans la cuve, laissée en place dans le compartiment de mesure :

0,05 ml de solution de LDH

Homogénéiser à l'aide d'un autre petit agitateur.

Lire la nouvelle densité optique ($D.O.t$) au bout de 2 minutes (pour plus de précision, on peut faire des lectures toutes les minutes, mais après deux minutes la variation de la densité optique devient insignifiante.)

Revérifier la valeur de la première détermination.

Selon les calculs établis, on passe de ces mesures au taux d'acide pyruvique de la manière suivante :

$$(D.O.o - D.O.t) \times 3,66 = \text{mg \% d'acide pyruvique.}$$

Avec cette méthode, le taux normal, chez l'homme, serait situé entre 0,43 et 0,64 mg p 100.

2° -- Dosage de l'acide α -céto-glutarique

L'acide α -céto-glutarique est dosé par une réaction de transamination qui le transforme, en présence de DPNH et d'ions ammonium contenus dans le sang, en acide glutamique tandis que le DPNH est oxydé : là encore il y aura diminution de la densité optique à 340 millimicrons. La réaction consomme une molécule de DPNH par molécule d'acide α -cétoglutarique.

Comme l'acide α -cétoglutarique n'est présent dans le sang qu'en très petites quantités (1,5 mg/l), l'épaisseur de la cuve de mesure doit être doublée (cuve de 20 mm). Mais la quantité de réactif placée dans la cuve fournie avec le spectrophotomètre, est trop faible pour

la capacité de cette cuve si bien qu'une partie importante du faisceau de lumière monochromatique passe au-dessus du contenu de la cuve.

Il est donc nécessaire d'obturer, à l'aide d'un ruban noir adhésif, totalement opaque, la partie supérieure de la fenêtre pratiquée dans les flasques chauffantes; ainsi le faisceau lumineux passe uniquement dans la solution à analyser. La pureté spectrale n'est pas sensiblement altérée par la légère augmentation, compensatrice, de largeur du faisceau de lumière ultra-violet.

Technique

Dans un tube à centrifuger entouré de glace pilée mesurer :

5 ml de sang prélevé sans garrot

+ 5 ml de solution d'acide perchlorique à 6 p 100 conservée dans la glace.

Mélanger très soigneusement avec un petit agitateur en verre, pendant au moins 5 minutes.

Centrifuger à 5.000 tours/minute, pendant 20 minutes.

Mesurer dans un tube à centrifuger parfaitement propre :

4 ml de surnageant

+ 0,8 ml de solution tampon de phosphate tripotassique 1 M.

Mélanger très soigneusement avec un petit agitateur en verre effilé, attendre 10 minutes en laissant le tube dans la glace pilée, afin de précipiter le perchlorate de potasse.

Après centrifugation et décantation dans un autre tube tout aussi propre, laisser réchauffer le liquide à 25°, dont le pH doit être de 7,6.

Dans la cuve de 20 mm d'épaisseur du spectrophotomètre, pipeter dans l'ordre suivant :

3,75 ml de surnageant

+ 0,05 ml de solution de DPNH

Mélanger soigneusement à l'aide d'un petit agitateur à bord mousse.

Placer la cuve dans le compartiment de mesure du spectrophotomètre et amener arbitrairement, la graduation de l'échelle mobile du galvanomètre à la D.O. = 0,5 et manoeuvrer le volet du "témoin mécanique", pour retrouver cette même graduation ; vérifier la stabilité de l'appareil (soit D.O.o.).

Simultanément au déclenchement d'un chronomètre introduire, dans la cuve laissée en place :

0,05 ml de solution de glutamo-deshydrogénase et bien mélanger avec un autre petit agitateur.

Lire la nouvelle valeur de la densité optique (D.O.t) après contrôle de la stabilité de l'appareil.

Selon les calculs établis, on passe de ces mesures au taux d'acide α -cétoglutarique de la manière suivante :

$(D.O.o - D.O.t) \times 2,68 = \text{mg p } 100 \text{ d'acide } \alpha\text{-cétoglutarique.}$

Avec cette méthode le taux normal chez l'homme serait situé entre 0,15 et 0,17 mg p cent.

3° - Dosage de l'acide lactique

Ce dosage se fait dans le sens inverse de celui de l'acide pyruvique : c'est l'acide lactique qui est transformé en acide pyruvique par la lactico-deshydrogénase (LDH) tandis que le DPN est réduit (DPNH). Il y a donc augmentation de la densité optique à 340 millimicrons. Afin d'avoir une réaction complète, l'acide pyruvique dès sa formation, est combiné au sein du milieu réactionnel en hydrazone par l'intermédiaire de l'hydrazine du tampon. Cette réaction est longue (1 heure) et doit être contrôlée par un tube témoin contenant de l'acide lactique, en solution dans l'acide perchlorique. Cette vérification se fait avec du lactate de lithium (sel assez peu hygroscopique recommandé par BARKER et SUMMERSON) (3).

Technique :

Dans un tube à centrifuger, entouré de glace, mesurer :

1 ml de sang prélevé sans stase veineuse

+ 1 ml de solution diluée à 6 p 100 d'acide perchlorique, conservée dans la glace.

Mélanger très soigneusement avec un petit agitateur en verre, pendant au moins 5 minutes.

Centrifuger à 5.000 tours/minute pendant 20 minutes.

Dans deux séries de tubes placer :

Série A

Série B

2 ml de solution tampon : glycine-hydrazine

0,10 ml de surnageant

0,03 ml de Solution de LDH

0,20 ml de solution de DPN

Placer les deux séries de tubes au bain-marie à 25°

Au bout d'une heure, mesurer au spectrophotomètre dans une cuve de 10 mm d'épaisseur, le changement de densité optique.

Faire le "zéro de densité optique" avec un tube de la série B ($D.O._B$) et mesurer ensuite, avec la même cuve, le tube correspondant de la série A ($D.O._A$).

Selon les calculs établis, on passe de ces mesures au taux d'acide lactique du sang de la manière suivante :

$$(D.O._A - D.O._B) \times 62,5 = \text{mg p 100, d'acide lactique.}$$

Avec cette méthode, le taux normal d'acide lactique chez l'homme serait situé entre 9 et 16 mg p 100.

B - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE

Le dosage de l'acide citrique dans le sang a déjà suscité de nombreuses méthodes qui sont presque toutes basées sur la transformation de l'acide citrique en pentabromacétone qu'une autre réaction s'efforce de conduire au dosage par colorimétrie.

Une des premières méthodes est celle de PÜCHER et les progrès de la colorimétrie ont amené l'apparition de nombreuses autres parmi lesquelles celle de PINCUS et NATELSON (107), de WEIL-MALHERBE (164), d'ETTINGER et GOLDBAUM (54), de TAYLOR (163), de MC ARDLE (101), BEUTLER (9), LICHTWITZ (93).

A ces méthodes on peut reprocher leur lenteur d'exécution, la nécessité d'extraire la pentabromacétone formée à l'aide de solvants difficiles à purifier et à conserver, et finalement l'obligation d'amplifier la coloration obtenue, ce qui éloigne de la précision théorique.

Ainsi avons-nous été conduit à étudier la méthode de MARIER et BOULET (100) : elle met à profit la réaction décrite par FÜRTH et HERRMANN (60) : coloration jaune donnée par l'acide citrique en présence de pyridine et d'anhydride acétique, dont la première application aux liquides biologiques a été faite par SAFFRAN et DENSTEDT (138). Dans certaines conditions très précises, elle permettrait même le dosage de l'acide itaconique, aconitique et fumarique (HARTFORD) (67).

Nous avons été conduit à quelques modifications imposées par la faible quantité d'acide citrique dans l'échantillon.

Réactifs :

Fluoracétate de sodium pur

Pyridine anhydre RP

Anhydride acétique RP

Acide trichloracétique

Acide citrique RP anhydre, obtenu par chauffage à 110° jusqu'à poids constant (environ 70 heures).

Technique

Le sang est recueilli dans un tube contenant de l'héparine (0,5 mg par ml) et un inhibiteur de la dégradation enzymatique de l'acide citrique : fluoracétate de sodium à la concentration M/250 (0,4 mg par ml). La quantité de sang nécessaire est de 4-5 ml.

Le sang est déprotéiné par un volume égal d'acide trichloracétique à 10 %. Après quelques instants de contact, on filtre sur un filtre en papier qui a, auparavant, été lavé avec 10 ml de la même solution d'acide trichloracétique et séché à l'air libre.

Dans un tube de verre Pyrex, à fond rond de 21 cm de longueur et 23 mm de diamètre, introduire :

2 ml de filtrat

2,6 ml de pyridine

Agiter et placer le tube dans un bain d'eau glacée et ajouter ensuite :

11,4 ml d'anhydride acétique

Agiter et porter dans un bain-marie à 37° où la coloration jaune se développe en 30 minutes.

La lecture de la densité optique est faite au spectrophotomètre de JOBIN et YVON, à la longueur d'onde de 400 millimicrons, dans une cuve de 4 cm d'épaisseur. On mesure aussi les densités optiques d'un témoin contenant à la place du filtrat, 2 ml d'eau distillée et d'un autre témoin avec 2 ml de la solution d'acide trichloracétique dilué au 1/2 auxquels on ajoute les autres réactifs.

L'étalonnage de l'appareil est effectué avec des quantités d'acide citrique allant de 10 à 40 microgrammes par ml. La courbe d'étalonnage est une droite passant par l'origine.

Certaines colorations parasites sont données par d'autres substances (FÜRTH et HERRMANN) (60):

Acide tartrique	coloration verte
Acide aconitique	" violet carmin
Acide tricarballoylique	" bleu rouge
Acide malonique	" acajou avec fluorescence verte

Les acides : malique, fumarique, maléique, citraconique, et itaconique donnent une coloration brune.

Le glucose, l'acide mucique, l'acide glutamique, l'acide succinique, l'asparagine, l'acide beta-oxybutyrique, l'acide lactique, l'acide glycolique, l'acide oxalique et la glycérine ne donnent aucune coloration.

Nous avons vérifié que l'héparine, le fluoracétate de soude, l'acide ascorbique, le penthiobarbital sodique et de faibles quantités d'acide pyruvique ne donnent pas de coloration.

Cette méthode permet, grâce à la présence d'un inhibiteur enzymatique, de trouver un taux d'acide citrique sanguin situé entre 39 et 40 microgrammes par ml, en l'absence de fluoracétate de sodium le taux d'acide citrique sanguin était trouvé voisin de 22 microgrammes, en accord avec les valeurs généralement admises sans addition d'agent anti-enzyme dès le prélèvement.

CHAPITRE VI

Résultats expérimentaux

La mise au point des techniques analytiques décrites dans les précédents chapitres de ce travail nous a conduit à effectuer un certain nombre d'investigations chez des chiens normaux en dehors de toute hypothermie. Les résultats obtenus viennent s'ajouter aux données témoins recueillies au cours des expériences de réfrigération artificielle, alors que, en début d'expérience, l'animal est encore normothermique. Elles méritent à ce titre d'être succinctement rapportées et nous nous limiterons aux dosages de l'acide citrique et aux résultats de la chromatographie sur papier.

1° - CITRATÉMIE DE L'ANIMAL NORMAL

La valeur du procédé de dialyse ayant été testée par l'extraction de l'acide citrique et le rendement de celle-ci étant apparu satisfaisant, il était intéressant et indispensable de connaître la valeur de la citratémie chez le Chien.

Les dosages ont été effectués sur du sang artériel fémoral, prélevé sur des animaux normaux, non narcosés, choisis au hasard parmi les chiens du chenil et simplement immobilisés sur une table.

Deux fois le sang ne fut recueilli que sur héparine, sans inhibiteur métabolique. Les chiffres trouvés alors sont relativement faibles, la citratémie étant chaque fois égale à 22 mg/l.

Tous les autres échantillons de sang furent recueillis sur iodacétate ou fluoracétate de sodium. Présentés par ordre de fréquence et exprimés en mg/l, les résultats obtenus sont les suivants (total de 16 dosages) :

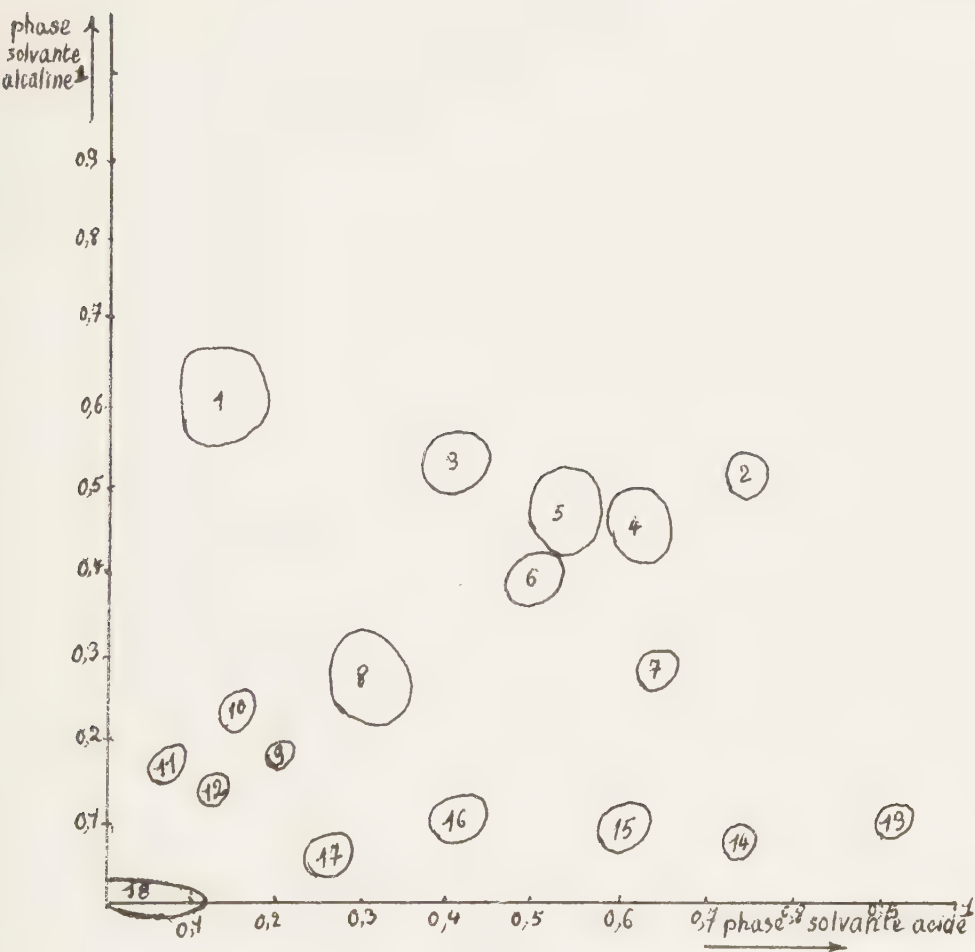
sur iodacétate : 38 40 38
 (42
 { 40 40 40 40 40
 sur fluoracétate : (39,8 39,6 39,6 39
 { 38 38 38 38
 (37
 { 34,2

On peut donc admettre que la citratémie artérielle chez le Chien est assez stable et normalement comprise entre 38 et 40 mg/l.

2° - CHROMATOGRAPHIE DU SANG D'ANIMAUX NORMAUX

La phase initiale de mise au point des techniques chromatographiques a été conduite avec du sang artériel de Chiens normaux, non narcosés, pris au hasard dans le chenil. Les premiers chromatogrammes ne montraient que deux spots : celui des chlorures et celui de l'acide lactique. Il apparaissait donc que les acides organiques, déjà révélés par d'autres auteurs, ne parvenaient pas jusque sur la feuille de papier. En effet, des acides témoins traités suivant le même protocole étaient parfaitement retrouvés alors que ces mêmes acides témoins disparaissaient quand ils étaient associés au sang. Il fallait donc compter avec une dégradation enzymatique. L'usage du fluoracétate de sodium et de glace pour maintenir le sang à l'abri des processus enzymolytiques a permis de réduire en proportion considérables la surface du spot de l'acide lactique tandis que d'autres spots apparaissaient.

L'identification n'a pu être obtenue que par comparaison avec des solutions d'acides témoins et des indications rapportées dans diverses publications consacrées à la chromatographie. En effet il n'était pas possible d'obtenir plusieurs chromatogrammes pour le même



- | | |
|---|-----------------------------|
| 1 = Chlorures | 11 = Acide urique |
| 2 = Acide hippurique | 12 = Acide tartrique |
| 3 = Phényl-acétyl-glutamine | 13 = ? |
| 4 = Acide β -hydroxybutyrique | 14 = Acide aconitique |
| 5 = Acide lactique | 15 = Acide tricarballélique |
| 6 = Acide α -céto-glutarique | 16 = ? |
| 7 = Acide succinique | 17 = Acide citrique |
| 8 = Acide malique | 18 = Phosphate + sulfate |
| 9 = ?) peut-être dérivés glycuroniques | + acide oxalique |
| 10 = ? (issus de la dégradation de l'hé- | |
| parine | |

Les chromatogrammes de ce type ont été obtenus à partir des expérimentations décrites page

échantillon de sang sous peine d'imposer des spoliations sanguines trop importantes. Or si un seul chromatogramme permet, par un révélateur convenablement choisi, de faire apparaître des spots, la présence de l'indicateur s'oppose à leur élution et à leur identification individuelle.

Nous prendrons comme schéma de description un des plus riches chromatogrammes (obtenus à partir de sang d'animaux d'expérimentation, normothermiques dont la citracémie était particulièrement élevée).

Des acides minéraux, élués en faible quantité sont régulièrement retrouvés : chlorures (1), phosphates et sulfates sous l'aspect d'une traînée (18) retenant l'acide oxalique.

Les spots d'acides lactique (5), citrique et isocitrique (17), malique (8), succinique (7) et aconitique (14) sont régulièrement obtenus. Le spot de l'acide α -cétoglutarique (6) se distingue assez mal de celui de l'acide lactique (5) : les deux spots encore détachés au moment où on révèle le chromatogramme par le vert de bromocrésol, deviennent confluent et se superposent ensuite en une tache très importante.

Dans certaines conditions d'autres taches sont révélées : la tache (3) correspond à de la phényl-acétylglutamine, la tache (15) est identifiée par NORDMANN à l'acide tricarballoylique, le spot (4) identifié à l'acide β -hydroxybutyrique, le spot (12) à l'acide tartrique avec à son voisinage, le spot (11) de l'acide urique.

Les taches (9) et (10) non identifiées pourraient peut-être correspondre à des dérivés glycuroniques détachés de l'héparine par activité enzymatique (un dialysat d'héparine isolée ne donne aucun spot acide).

Quant aux spots (16) et (13) ils pourraient être interprétés comme des produits d'hydrolyse alcaline: ils n'ont jamais été rapportés par NORDMANN qui fait subir au sang un traitement acide.

EXPERIMENTATION CHEZ LE CHIEN EN HYPOTHERMIE

De très nombreuses méthodes permettent d'induire l'hypothermie expérimentale chez le Chien. Toutes associent, à une réfrigération énergétique, des agents pharmacodynamiques qui réduisent, en proportion variable d'ailleurs, l'efficacité des mécanismes thermorégulateurs (frisson). Parmi ces agents, la simple anesthésie, en particulier par les barbituriques, est un moyen généralement efficace. Toute notre expérimentation a donc été menée chez le Chien, sous narcose au penthiobarbital sodique (1), à l'exception d'une expérience chez un animal chlorallosé.

La nécessité de recueillir des échantillons de sang veineux coronaire afin d'y détecter d'éventuels métabolites caractéristiques du métabolisme cardiaque, nous a amené à réaliser cette expérimentation chez le Chien, à thorax ouvert. Tous les animaux ont donc subi, dans un premier temps, une large thoracotomie médiane, par une incision longitudinale du sternum. Le péricarde est lui-même incisé sur sa ligne médiane et ses deux bords sont amarrés à la paroi thoracique, réalisant ainsi une sorte de berceau dans lequel se trouve le cœur.

Il est possible en soulevant le bloc cardiaque et en le basculant, d'avoir accès au sinus veineux coronaire et de ponctionner celui-ci. Si on prend la précaution d'obturer par une compression digitale, la zone d'abouchement du sinus veineux coronaire dans l'oreillette droite, le sang qu'on peut aspirer à l'aide d'une seringue est uniquement celui qui provient du tissu myocardique, car il ne peut se faire alors de mélange avec des échantillons de sang veineux provenant de l'oreillette droite et des veines caves.

Sur le même animal, la dénudation, au triangle de Scarpa, du paquet vasculaire artériel et veineux fémoral permet de recueillir, par ponction de ces vaisseaux, des

(1) Il n'est pas possible de préciser la quantité exacte de penthiobarbital sodique injecté; on utilise en général une solution à 5p100, injectée par voie veineuse "à la demande", c'est à dire en quantité juste suffisante pour produire une narcose chirurgicale. L'injection ultérieure de petits volumes de cette solution (0,5 à 1 ml) ne devient nécessaire que si l'animal a tendance à se réveiller et en particulier s'il se met à frissonner au cours de la réfrigération.

échantillons de sang artériel et de sang veineux périphériques.

La thoracotomie nécessite l'utilisation d'un système de ventilation artificielle dès l'ouverture du thorax. Ceci a été réalisé au moyen d'une pompe, insufflant rythmiquement sous pression, dans les poumons soit de l'air atmosphérique soit, pour des raisons qui seront discutées ultérieurement, un mélange gazeux ayant une composition particulière. Cette insufflation est réalisée grâce à une canule, mise en place dans la trachée par une trachéotomie préalable.

L'hypothermie a été induite par des techniques différentes. Dans nos premières expériences, la cavité thoracique de l'animal, étant largement ouverte, est partiellement remplie de glaçons de serum physiologique (Na Cl 9 p 1.000). Des glaçons identiques sont également introduits en abondance dans la cavité abdominale. Dans ces conditions, la réfrigération est extrêmement rapide. En 1 heure en moyenne, la température atteinte approche 25° - 26° et le coeur est sur le point d'entrer en fibrillation. Malgré l'utilisation de la solution chlorurée sodique isotonique, nous avons remarqué qu'il existait, en particulier au niveau des poumons en contact avec ce système réfrigérant, une importante infiltration oedémateuse. Ceci se retrouve à un moindre degré au niveau du péritoine et des viscères abdominaux. Craignant une incidence métabolique possible de ces perturbations hydro-électrolytiques, les réfrigérations ultérieures ont été effectuées en entourant l'animal, préalablement tondu lorsqu'il était porteur de longs poils, de sacs de matière plastique remplis de glace pilée. La réfrigération est dans ces conditions, moins rapide mais il n'existe pas de désordres hydro-électrolytiques et on peut penser d'ailleurs qu'une hypothermie plus lente à s'installer est une circonstance favorable à la détection de métabolites éventuellement caractéristiques.

Le dernier problème technique qu'il y eut à résoudre était lié à l'utilisation de la ventilation artificielle. Les incidences sur l'équilibre acide-base du milieu intérieur, et cela indépendamment de celles spécifiquement liées à l'hypothermie, peuvent, ainsi que nous l'avons souligné dans le chapitre III de ce travail, perturber gravement le métabolisme cellulaire. Ceci était d'autant plus

à redouter que la détermination de la réserve alcaline au cours de nos premières expériences nous avaient montré un effondrement de celle-ci. Il était donc logique d'essayer de maintenir une concentration en bicarbonate à peu près constante et aussi proche que possible de la normale. C'est pourquoi les dernières expériences d'hypothermie ont été menées sous respiration artificielle, mais avec alimentation de la pompe qui assure l'insufflation pulmonaire, par un mélange gazeux dont la P_{O_2} et surtout la

P_{CO_2} sont nettement plus élevées que dans l'air atmosphérique puisque sa composition est la suivante (1) :

(air atmosphérique	45 p 100
{ gaz carbonique	5 p 100
(oxygène	50 p 100

Dans toutes les expérimentations, les échantillons de sang ont été recueillis dès le début, immédiatement après la narcose, l'animal étant normothermique, puis au fur et à mesure de l'évolution de la réfrigération. On peut toutefois signaler qu'il n'est pas possible de répéter les prélèvements en raison de l'importance de la soustraction sanguine qui est chaque fois effectuée. La nécessité d'examen comparatifs conduit en effet, à recueillir trois échantillons différents :

- sang artériel (artériel fémoral)
- sang veineux périphérique (veineux fémoral)
- sang veineux coronaire

En raison de la multiplicité des investigations à effectuer (dosage des acides citrique, α -céto-glutarique, pyruvique et lactique, détection chromatographique d'autres métabolites éventuels) chaque prélèvement représente au minimum 30 à 40 ml de sang, soit pour les trois échantillons environ 100 ml. Comme les chiens utilisés pour les expérimentations, pèsent en moyenne 12 à 15 kg,

(1) Dans ce mélange gazeux, sous 760 mm Hg, $P_{O_2} = 448$ mm Hg
et $P_{CO_2} = 38$ mm Hg

ceci réalise une spoliation sanguine notable qu'on ne peut répéter d'une manière inconsidérée.

En pratique, nous nous sommes contenté de recueillir les échantillons de sang ci-dessus indiqués, en début d'expérience avant la réfrigération, et de recommencer la même opération beaucoup plus tard, lorsqu'on a l'impression d'arriver à la période préfibrillatoire. Bien souvent d'ailleurs, nous avons été gagné de vitesse par cet incident. La manipulation du coeur nécessaire pour avoir accès au sinus veineux coronaire est un facteur mécanique qui déclenche la fibrillation. Dans ces conditions d'ailleurs, la récolte du sang veineux coronaire est difficile et ne peut être assurée que par un massage cardiaque manuel simultané.

Nous rapporterons les protocoles opératoires suivis dans chacune de nos expériences d'hypothermie, indiquant à la suite, pour chacune d'entr'elles, les résultats de nos investigations biochimiques.

HYPOTHERMIE du 15 Mars 1962

Chien mâle de 13,100 kg

Narcose au penthiobarbital sodique intraveineux

Préparation des vaisseaux fémoraux

Mise en place d'une canule trachéale

9 h.10 - prélèvement de 30 ml de sang artériel fémoral
prélèvement de 30 ml de sang veineux fémoral

9 h.17 - prélèvement de 3 ml de sang veineux pour réserve alcaline

9 h.20 - sous respiration artificielle à l'air atmosphérique, ouverture du thorax par une incision longitudinale médiane du sternum

9 h.26 - prélèvement de sang par ponction du sinus coronaire.

Début de la réfrigération : on remplit le thorax avec du sérum refroidi et des cubes de sérum physiologique congelé. Par l'incision thoracique prolongée, on peut avoir accès à la cavité abdominale. Celle-ci est alors partiellement remplie de glaçons de sérum physiologique.

9 h.36 - Température rectale = 36°

9 h.48 - Température rectale = 34°

10 h.00 - Température rectale = 30°

10 h.25 - Prélèvement de sang veineux fémoral (30 ml)
Prélèvement de sang artériel fémoral (30 ml) + réserve alcaline

10 h.30 - Prélèvement de sang par ponction du sinus coronaire (30 ml)

10 h.49 - Température rectale = 28°

Mais le coeur entre en fibrillation lente et la réfrigération ne peut être poursuivie. Il semble que la température propre du coeur, au milieu du système réfrigérant qui remplit le thorax, soit en réalité inférieure à la température rectale.

Résultats

1° - Dosage de l'acide carbonique plasmatique
(ion CO_3H^-) (1)

$$S_1 = 33,75 \text{ mEq/l}$$

$$S_2 = 18 \text{ mEq/l}$$

2° - Dosage de l'acide citrique (en mg/l)

	Normothermie	Hypothermie 28°
Sang artériel fémoral	40	52,4
Sang veineux fémoral	38,8	55
Sang veineux coronaire	34	52,4

3° - Résultats des chromatogrammes

L'examen comparatif des six feuilles de chromatographie ne montre pas de différence significative entre les divers prélèvements; dans tous les cas on retrouve que les acides lactique, citrique et isocitrique, malique, succinique et aconitique.

§

(1) Tous les dosages ont été effectués à l'Auto-Analyseur Technicon. Le CO_2 plasmatique, dégagé par un acide fort, détermine un changement de coloration d'une solution alcaline contenant un indicateur de pH (phénolphtaléine). La décoloration de cette solution est suivie, en continu, par un colorimètre couplé à un enregistreur. L'étalonnage de la courbe de dosage est obtenu avec des solutions de bicarbonate de sodium.

HYPOTHERMIE du 21 Mars 1962

Chien mâle de 13,600 kg

- 8 h.00 - narcose par injection intra-veineuse de 140 ml de chloralose. (solution à 8 p 1000)
- préparation de la région crurale et des vaisseaux fémoraux gauches.
- mise en place d'une canule trachéale.
- 8 h.30 - prélèvement de sang artériel fémoral 10 ml (S_0)
- 8 h.50 - prélèvement de sang artériel fémoral 30 ml (S_1)
- 9 h.00 - prélèvement de sang veineux fémoral 30 ml (S_2)
- 9 h.05 - sous respiration artificielle à l'air atmosphérique, ouverture du thorax par une incision longitudinale médiane du sternum.
- 9 h.30 - prélèvement de sang par ponction du sinus coronaire (S_3)
Température rectale = 38°
- 9 h.32 - prise de sang veineux fémoral pour réserve alcaline (S_4)
début de l'hypothermie : on remplit partiellement le thorax et la cavité abdominale avec des cubes de sérum physiologique congelé.
- 9 h.40 - Température rectale = 34°
- 9 h.45 - Température rectale = 33°
- 10 h.00 - début de fibrillation cardiaque
prélèvement de sang dans l'oreillette droite (sang rouge oxygéné, à la température de 18°) (S_5)
Prélèvement de sang dans le sinus coronaire à la température de $15,5^\circ$ (S_6).
- 10 h.10 - Prélèvement dans la veine cave sus-diaphragmatique (S_7)
- 10 h.20 - Température rectale = 28°
Prélèvement de sang dans l'oreillette droite pour réserve alcaline (S_8)

Résultats

1° - Dosage de l'acide carbonique plasmatique
(ion CO_3H^-)

$$S_4 = 13,25 \text{ mEq/l}$$

$$S_5 = 10,75 \text{ mEq/l}$$

2° - Dosage de l'acide citrique (en mg/l)

en normothermie	Sang artériel fémoral (S_0)	32
	Sang artériel fémoral (S_1)	40
	Sang veineux fémoral (S_2)	44
	Sang veineux coronaire (S_3)	43
en hypothermie	Sang de l'oreillette droite (S_5)	43
	Sang de la veine cave sus- diaphragmatique (S_7)	40,5
	Sang veineux coronaire (S_6)	46,5

3° - Résultats des chromatographies :

Les spots des six chromatogrammes sont entièrement similaires. On ne met en évidence que les mêmes acides déjà identifiés dans l'hypothermie précédente : acides lactique, citrique et isocitrique, malique, succinique, et aconitique. On ne retient pas les faibles variations dans les surfaces des spots.

HYPOTHERMIE du 7 Avril 1962 ---

Chien femelle 12 kg

Narcose au penthiobarbital sodique à 8 h.30

Canule trachéale

Deux spiromètres de Hutchinson sont remplis du mélange gazeux suivant :

(air atmosphérique	45 p 100
(gaz carbonique	5 p 100
(oxygène	50 p 100

La pompe à respiration artificielle prélève dans un des deux spiromètres le mélange gazeux qu'elle insuffle dans les poumons de l'animal. Lorsque ce spiromètre est vide, on alimente la pompe par la réserve gazeuse constituée dans le deuxième spiromètre. Pendant son utilisation, le premier appareil est à nouveau rempli. Le fonctionnement alterné évite toute interruption dans le régime ventilatoire.

Préparation des vaisseaux fémoraux gauches.

9 h.15 - prélèvement de sang artériel fémoral (40 ml)
prélèvement de sang veineux fémoral (45 ml) S₁

9 h.20 - sous respiration artificielle avec le mélange gazeux spécial, ouverture du thorax par une incision longitudinale médiane du sternum.

9 h.30 - ponction du sinus veineux coronaire

9 h.45 - début de la réfrigération par vessies de glace disposées autour du corps et par des glaçons de sérum physiologique introduits dans la cavité abdominale
Température cardiaque = 33° (un thermomètre est placé sous l'auricule droit, dans le sillon auriculo-ventriculaire).

10 h.00 - Température cardiaque = 28°

10 h.07 - Prélèvement de sang veineux fémoral pour réserve alcaline (S₂)

10 h.16 - brutal ralentissement cardiaque, l'oreillette fibrille

fréquence ventriculaire = 16

température cardiaque = 26°

10 h.20 - Le rythme cardiaque est à nouveau régulier et plus rapide. L'oreillette ne fibrille plus. On constate les dissociations iso-rythmiques classiques.

Fréquence cardiaque = 30

Température cardiaque = 25°

10 h.30 - Le coeur est pratiquement arrêté

10 h.40 - Prélèvement de sang coronaire (mais ceci est très difficile car le débit coronaire est pratiquement nul malgré les massages cardiaques et il y a mélange de sang coronaire et de sang cave).

10 h.45 - Prélèvement de sang artériel dans l'aorte

10 h.47 - Prélèvement de sang veineux dans la veine cave supérieure (S_3)

Résultats

1° - Dosage de l'acide carbonique plasmatique
(ion CO_3H^-)

$$S_1 = 24,5 \text{ mEq/l}$$

$$S_2 = 25 \text{ mEq/l}$$

$$S_3 = 22 \text{ mEq/l}$$

2° - Dosage des acides citriques, lactique et α -cétoglutarique (en mg/l)

		acide citrique	acide lactique	acide α -cétoglutarique
avant hypothermie	Sang artériel fémoral	33	237	1,0
	Sang veineux fémoral	32	262	1,6
	Sang veineux coronaire	30	347	0,9
en fin hypothermie	Sang artériel aortique	31	487	0,8
	Sang veineux cave	31	487	0,8
	Sang veineux coronaire	31	487	0,8

3° - Résultats des chromatographies

Si on met en évidence les mêmes acides que dans les expériences antérieures (acide lactique, citrique et isocitrique, malique, succinique et aconitique) on remarque que la surface des spots apparaît un peu moins importante dans les chromatogrammes correspondant aux prélèvements obtenus en hypothermie.

HYPOTHERMIE du 12 Avril 1962

Chien femelle 14,500 kg

Narcose au penthiobarbital sodique à 10 h.30

Mise en place d'une canule trachéale

La respiration artificielle est entretenue selon la technique décrite dans l'expérience du 7 Avril 1962

Préparation des spiromètres avec le mélange suivant :

(air atmosphérique	45 p 100
(gaz carbonique	5 p 100
(oxygène	50 p 100

11 h.15 - dénudation des vaisseaux fémoraux droits

11 h.30 - prélèvement de sang artériel fémoral (35 ml)

11 h.37 - prélèvement de sang veineux fémoral (35 ml)

11 h.40 - 11 h.50 - thoracotomie médiane et respiration artificielle

11 h.50 - 11 h.55 - ponction dans le sinus coronaire (35 ml)

12 h.10 - début de la réfrigération par vessies de glace placées autour du corps de l'animal
Température cardiaque = 36° (thermomètre placé sous l'auricule droit, dans le sillon auriculo-ventriculaire)

12 h.30 - Température cardiaque = 34°

12 h.48 - Température cardiaque = 32°

13 h.05 - Prélèvement de sang dans la veine fémorale pour réserve alcaline (S_1)

13 h.37 - Température cardiaque = 28°

13 h.54 - Température cardiaque = 26°
Fréquence cardiaque = 80

14 h.00 - Température cardiaque = 26°

14 h.18 - Température cardiaque = 25°
Fréquence cardiaque = 58

14 h.45 - Prélèvement de sang dans la veine fémorale pour réserve alcaline (S)₂

14 h.55 - Brutalement fibrillation ventriculaire. Depuis quelques minutes d'ailleurs le coeur présentait quelques extrasystoles.

Prélèvement de sang dans le sinus coronaire, mais le débit est très faible malgré le massage cardiaque et il vient du sang cave.

Prélèvement dans l'aorte

Prélèvement de sang dans la veine cave supérieure.

Résultats

1° - Dosage du gaz carbonique plasmatique

$$S_1 = 22 \text{ mEq/l} \quad (\text{ion } \text{CO}_3\text{H}^-)$$

$$S_2 = 19,8 \text{ mEq/l}$$

2° - Dosage des acides : citrique, α -cétoglutarique, lactique et pyruvique en mg/l

<u>avant</u> <u>hypothermie</u>	acide citrique	acide α -ceto glutarique	acide lactique	acide pyruvique
Sang artériel fémoral	26	1,7	230	10
Sang veineux fémoral	34	1,1	260	15
Sang veineux coronaire	32	1,0	210	14
<u>En fin d'hypothermie</u>				
Sang aortique	37	0,9	320	9,2
Sang veineux cave	37	0,9	300	9,4
Sang veineux coronaire	36	0,9	280	9,1

3° - Résultats des chromatogrammes

On ne relève pas de différences appréciables entre les divers prélèvements; les mêmes taches sont obtenues sur toutes les feuilles : acides lactique, malique, citrique et isocitrique, succinique et aconitique.

HYPOTHERMIE du 4 Mai 1962

Chien mâle 15 kg

Narcose au penthiobarbital sodique à 8 h.30

Mise en place d'une canule trachéale

Préparation des vaisseaux fémoraux gauches

Préparation des spiromètres avec le mélange suivant :

(air atmosphérique	45 p 100
(gaz carbonique	5 p 100
(oxygène	50 p 100

La ventilation artificielle est entretenue selon la technique décrite dans l'expérience du 7 avril 1962.

8 h.40 - Prélèvement de sang veineux fémoral (S_1)

8 h.45 - Prélèvement de sang artériel fémoral

9 h.05 - Sous-respiration artificielle avec le mélange gazeux spécial, thoracotomie médiane

9 h.22 - Ponction du sinus veineux coronaire
Température cardiaque = 36° (thermomètre placé dans le sillon auriculo-ventriculaire, sous l'auricule droit)

9 h.30 - Début de la réfrigération par sacs de polyéthylène remplis de glace, disposés autour du corps

9 h.50 - Température cardiaque = 33°

10 h.10 - Température cardiaque = 31°

10 h.35 - Température cardiaque = 28°
Fréquence cardiaque = 96 (rythme sinusal)

- 10 h.45 - Température cardiaque = 27°
Fréquence cardiaque = 86
- 10 h.54 - Prélèvement de sang veineux fémoral (S_2)
- 10 h.55 - Prélèvement de sang artériel fémoral
- 10 h.57 - Température cardiaque = 26°
Fréquence cardiaque = 72
- 11 h.03 - Prélèvement de sang veineux coronaire.
Prélèvement très satisfaisant : on a ouvert le sinus coronaire d'un coup de ciseaux, en obturant ensuite, avec le doigt, l'orifice qui débouche dans l'oreillette droite. Le sang qui s'écoule dans le sac péricardique est donc uniquement du sang provenant du muscle cardiaque. On l'aspire dans le sac péricardique. Il n'y a pas de mélange avec du sang cave comme dans les prélèvements des autres expériences.
- 11 h.10 - Température cardiaque = 25° - 26°
Fréquence cardiaque = 60

Résultats

1° - Dosage de l'acide carbonique plasmatique
(ion CO_3H^-)

$$S_1 = 20,90 \text{ mEq/l}$$

$$S_2 = 20,90 \text{ mEq/l}$$

...

2° - Dosage des acides citrique, α -cétoglutarique, pyruvique et lactique (en mg/l)

	acide citrique	acide α -cétoglu- tarique	acide lactique	acide pyruvique
<u>Avant</u> <u>hypothermie</u>				
Sang artériel fémoral	30	1,07	189	17
Sang veineux fémoral	30	2,1	225	10,2
Sang veineux coronaire	26	0,67	123	4,8
<u>En fin d'</u> <u>hypothermie</u>				
Sang artériel fémoral	30,4	0,54	119	8,1
Sang veineux fémoral	30	0,58	172	6,6
Sang veineux coronaire	26	0,54	103	2,5

3° - Résultats des chromatogrammes

Dans cette expérimentation encore on ne peut pas mettre en évidence de changements importants liés à l'origine anatomique ou chronologique des prélèvements. Dans les six échantillons, seuls apparaissent les acides citrique, malique, lactique, aconitique et succinique.

DISCUSSION

CITRATÉMIE DE L'ANIMAL NORMAL

Les valeurs obtenues chez des animaux simplement immobilisés sur une table, montrent que pour la grande majorité d'entr'eux, la citratémie est comprise entre 38 et 40 mg/l. Ce taux est nettement plus élevé que celui qui est habituellement rapporté. En effet la valeur admise est comprise entre 20 et 22 mg p 1.000, mais il s'agit de dosages effectués sur des échantillons de sang recueillis sans la protection d'agents anti-enzymes efficaces.

L'importance d'un inhibiteur de la dégradation enzymatique de l'acide citrique ressort encore des faits suivants : dans quelques cas, au cours de ce travail, du sang a été recueilli soit simplement sur héparine, soit sans avoir été suffisamment mélangé avec le fluoracétate. Dans ces échantillons, les chiffres obtenus (22 à 26 mg p 100) correspondent aux taux habituellement admis.

Il apparaît donc que la valeur de la citratémie normale, du moins chez le Chien, devrait être reconsidérée avec une valeur voisine de 38 à 40 mg p 1.000.

CITRATÉMIE DE L'ANIMAL REFROIDI

Si on rassemble les valeurs de la citratémie trouvée au cours de ces différentes expériences d'hypothermie, on constate qu'il existe d'une expérience à l'autre des écarts assez importants.

Tout d'abord et d'une façon générale, qu'il s'agisse de sang veineux périphérique ou coronaire ou qu'il s'agisse de sang artériel, les chiffres trouvés avant toute réfrigération, alors que les animaux sont en normo-

thermie mais qu'ils sont narcosés, sont inférieurs à 38 40 mg/l, valeur que nous sommes amenés à considérer comme normale dans le sang artériel du Chien non narcosé et n'ayant subi aucune agression chirurgicale.

D'autre part les dosages effectués sur ces échantillons recueillis en hypothermie, montrent au premier abord une assez grande dispersion des résultats. Dans certaines expériences, en particulier celle du 15 mars 1962, la citratémie à la fin de l'hypothermie, est considérablement augmentée. Dans d'autres au contraire, et en particulier dans les expériences du 7 avril, 12 avril et 4 Mai, le taux de l'acide citrique dans le sang, et cela quelle que soit l'origine anatomique des échantillons, reste pratiquement inchangé entre l'état normothermique et hypothermique.

Ces variations, lorsqu'elles existent, peuvent sembler-t-il, être rattachées à des facteurs qui n'ont aucun rapport avec l'hypothermie :

Tout d'abord la citratémie relativement basse endébut d'expérience chez des animaux encore normothermiques semble relever surtout de l'anesthésie et peut-être d'une dépression discrète de la fonction respiratoire qui lui est consécutive.

Nous avons en effet vérifié que sur des animaux utilisés pour d'autres types de recherches expérimentales, les valeurs de la citratémie sont plutôt inférieures à celles que nous avons trouvées chez des animaux normaux. Il s'agissait d'animaux narcosés et ayant subi un traumatisme opératoire sévère (destruction médullaire). Les chiffres recueillis permettent de dire que le choc opératoire n'est pas, par lui-même, un facteur perturbateur de la citratémie tant que les animaux conservent une ventilation spontanée efficace. En effet chez le chien amyé-lé, la quantité d'acide citrique que l'on trouve dans le sang ne se modifie pratiquement pas dans les heures qui suivent la destruction médullaire. Ceci apparaît dans les résultats que nous avons recueillis au cours de deux expériences :

Chien anesthésié au chloralose, démyélinisé, maintenu à 38° sur table chauffante :

	mg/l
N° 1	
1 h. après l'anesthésie	35
2 h. " "	32
4 h. " "	32
7 h. " "	32

	mg/l
N° 2	
avant anesthésie	20
8 heures après	26
(le sang est partiellement coagulé dans les tubes de prélèvement)	

Les valeurs particulièrement basses de la citratémie dans ces deux derniers échantillons peuvent être rattachées au fait que dans les tubes de sang insuffisamment mélangé à la solution de fluoracétate et d'héparine, la dégradation a pu se poursuivre.

L'importance de la ventilation nous apparaît par contre nettement, dans les résultats des dosages d'acide citrique effectués sur d'autres séries d'animaux normothermiques ou faiblement hypothermiques, mais ayant subi une thoracotomie nécessitant l'installation d'une ventilation artificielle non contrôlée (air atmosphérique) et cela pendant plusieurs heures. Dans tous les cas le taux d'acide citrique du sang est élevé. Bien plus, dans certaines expériences, on peut suivre cette évolution ascendante de la citratémie en fonction du temps. Ceci apparaît nettement sur les chiffres ci-dessous rapportés :

<u>Chien N° 1</u>	Citratémie en mg/l
4 heures après la thoracotomie	
Prélèvement de sang carotidien (à la carotide dénudée)	90
Prélèvement de sang du coeur droit par un cathéter	91
Ponction du sinus veineux coronaire	96

<u>Chien N° 2</u>	Citratémie en mg/l
4 heures trente après la thoracotomie	
Prélèvement de sang carotidien (à la carotide dénudée)	55
Prélèvement de sang artériel fémoral	50
Ponction du sinus veineux coronaire	50

<u>Chien N° 3</u>	Citratémie en mg/l
1 heure après la Thoracotomie	
- Sang artériel fémoral	42
2 h.30 après la thoracotomie	
- Sang artériel fémoral	43
3 h.30 après la thoracotomie	
- Sang artériel par ponction de la carotide dénudée	52
- Sang prélevé par ponction du sinus veineux coronaire	55

<u>Chien N° 4</u>	Citratémie en mg/l
15 minutes après l'anesthésie, avant la thoracotomie :	
- Sang veineux par ponction de la veine jugulaire dénudée	36
1 h.15 après l'anesthésie, 1 h. après la thoracotomie	
- Sang veineux jugulaire	40
2 h. après la thoracotomie	
- Sang veineux jugulaire	40
4 h.15 après la thoracotomie	
- Sang prélevé par ponction directe du ventricule droit	50

Ces résultats permettent de relier à la ventilation artificielle et à ses conséquences sur les systèmes tampons du sang (alcalose gazeuse avec abaissement de la réserve alcaline) cette augmentation de la citratémie observée régulièrement chez les animaux en respiration artificielle.

Bien que simultanément aux dosages d'acide citrique effectués sur les animaux normothermiques, nous n'ayons pas contrôlé la valeur exacte de la réserve alcaline, les résultats obtenus en hypothermie permettent cependant de rattacher à une altération de l'équilibre acido-basique, cette hypercitratémié.

En effet, dans les expériences qui ont été menées en hypothermie, sous ventilation artificielle réalisée avec l'air atmosphérique, les dosages du CO_2 plasmatique (ion CO_3H^-), en particulier dans l'expérience du 15 Mars 1962, montrent que la réserve alcaline atteint une valeur extrêmement basse ($\text{CO}_2 = 18 \text{ mEq/l}$). C'est la raison pour laquelle il a, par la suite, été installé une ventilation artificielle avec un mélange gazeux hyperoxygène et surtout hypercapnique. Dans ces conditions la réserve alcaline ne varie pratiquement pas entre le début et la fin de l'expérience et l'on observe parallèlement la constance de la citratémié.

Acide pyruvique et acide lactique

Les résultats sont assez dispersés et trop parcelaires pour en tirer une conclusion valable.

Acide α -cétoglutarique

Les résultats sont peu nombreux. Cependant sa valeur semble relativement abaissée dans l'hypothermie et cette variation apparaît surtout dans les résultats recueillis lors de l'expérience du 4 Mai 1962. Cet abaissement porte d'ailleurs sur tous les échantillons de sang quelle qu'en soit l'origine anatomique. Et en hypothermie on ne peut retenir aucune différence dans l' α -cétoglutarémié -si on peut employer ce néologisme- dans les divers échantillons de sang sur lesquels le dosage a été effectué.

Si on oppose la constante de la citratémié et la diminution du taux de l'acide α -cétoglutarique, on peut penser que c'est entre ces deux métabolites, dans les premières étapes du cycle de KREBS que l'hypothermie exerce ses effets dépresseurs majeurs sur les enzymes responsables du métabolisme intermédiaire. Ce résultat est aussi comparable à ceux rapportés par HELLIG (69).

Ceci n'est évidemment qu'un premier essai d'approche d'un problème biochimique difficile et il est certain qu'une telle conclusion devra être consolidée par l'apport de nouvelles données numériques.

CONCLUSIONS

1° → Les problèmes posés par les perturbations métaboliques induites par l'hypothermie chez le Mammifère nous ont conduit à envisager des recherches d'ordre quantitatif et qualitatif sur les métabolites présents dans le sang du Chien normothermique et en hypothermie.

2° → Les recherches qualitatives ont été effectuées par chromatographie sur papier bidimensionnelle. Elles ont nécessité la mise au point préalable d'une technique de déprotéinisation du plasma qui soit efficace, afin de permettre la chromatographie et qui n'altère pas, ou fort peu, les métabolites présents dans le sang. Ceci a été réalisé par une dialyse du sang total en présence d'inhibiteur métabolique (fluoracétate) suivie d'une désionisation sur résine échangeuse.

3° → Les métabolites ainsi mis en évidence ont été les suivants :

Acide lactique
Acide citrique et isocitrique
Acide malique
Acide succinique

Ces quatre molécules ont pu être caractérisées d'une façon habituelle. Plus occasionnellement, sans qu'il soit possible de dire quelle est la cause exacte de leur absence ou de leur présence :

Acide aconitique
Acide α-cétoglutarique
Acide tartrique

Enfin de nombreux spots n'ont pas été identifiés. Ils signifient cependant la valeur de la méthode en tant que technique d'étude des métabolites intermédiaires dans le sang.

4° - Les recherches qualitatives n'ont permis de déceler aucune différence caractéristique et significative entre le sang artériel, veineux périphérique ou veineux coronaire, que les échantillons proviennent d'animaux normothermiques ou hypothermiques.

5° - Les recherches quantitatives ont porté sur les acides :

citrique
~~α~~-cétoglutarique
 pyruvique
 lactique

Ils ont été dosés par des méthodes enzymatiques ou colorimétriques. Des résultats recueillis, on ne peut retenir que les points suivants :

a) L'anesthésie au penthiobarbital sodique ou au chloralose entraîne en général une diminution du taux de l'acide citrique du sang (environ -30 p 100).

b) L'hyperventilation non contrôlée (respiration artificielle) est par contre suivie d'une augmentation notable de l'acide citrique.

Ceci se retrouve dans tous les échantillons de sang et peut être, à notre avis, mis sur le compte des conséquences métaboliques des perturbations de l'équilibre acide-base liées soit à une hypoventilation (Hypercapnie) due à la narcose, soit à l'hyperventilation (hypocapnie, alcalose gazeuse) de la respiration artificielle. Cet argument est d'autant plus valable que, au cours d'hypothermie provoquée, le taux de l'acide citrique sanguin augmente, comme en normothermie lorsque les animaux en respiration artificielle sont ventilés avec l'air atmosphérique. Par contre la citratémie demeure inchangée en ventilation contrôlée avec un mélange gazeux hypercapnique (air 45 p 100 + O₂ 50 p 100 + CO₂ 5 p 100) destiné à maintenir pendant toute l'expérience une concentration en bicarbonate aussi voisine que possible de la normale.

c) Les variations des taux d'acides pyruvique et lactique ne nous semblent pas significatives et sont, de ce fait, difficilement interprétables.

d) Par contre celles de l'acide α -cétoglutarique semblent plus intéressantes. Sa concentration plasmatique diminue en hypothermie. Si on compare ceci au fait que la citratémie demeure normale, on peut admettre un blocage, au moins partiel, du cycle de Krebs chez les animaux refroidis, blocage qui s'effectue entre l'acide citrique et α -cétoglutarique. Cet effet apparaît comme très général et non spécifique du myocarde.

Le Président de Thèse .

H.HERMANN

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 13 juin 1962

Vu, le Doyen :

H.HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P.LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

1. ADLER J., SHU-FONG WONG, LARDY H.A. - The metabolism of itaconic acid by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1957, 229, 870-879.
2. AXELROD D.R. et BASS D.E. - Electrolytes and acide-base balance in hypothermia. *Amer. J. Physiol.* 1956, 186, 31-34.
3. BARKER S.B., SUMMERSON W.H. - The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* 1941, 138, 535-554.
4. BARTLETT G.R., BARRON E.S.G. - The effect of fluoracetate on enzymes and on tissue metabolism for the study of the oxidative pathway of pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 1947, 170, 67-82.
5. BAUER H. - Die Brenztraubensäure-Konzentration im Blut von multiplen und Kontrollfällen. *Biochem. Z.* 1956, 327, 491-500.
6. BERGSTRAND A., STERKY G. - Renal function in hypothermia. *Acta Physiologica Scand.* 1954, 31, 13-21.
7. BERNHARD W.F., CARROLL S.E., SCHWARZ H.F., GROSS R. - Metabolic alteration associated with profound hypothermia and extracorporeal circulation in the dog and man. *J. Thorac. Cardiovas. Surg.* 1961, 42, 792-803.
8. BESSMAN S.P., CORNLEY R.A. - Biochemical changes in human beings during refrigeration anesthesia. *Ann. N-Y Acad. Sci.* 1959, 80, 540-562.
9. BEUTLER E., YEH M.K. - A simplified method for the determination of citric acid. *J. Lab. Clin. Med.* 1959, 54, 125-132

10. BIGELOW W.G., LINDSAY W.K., GREENWOOD W.F. - Hypothermia. *Ann. Surg.* 1950, 132, 849-866.
11. BIGELOW W.G., CALLAGHAN J.C., HOPPS J.A. - General hypothermia for experimental intra-cardiac surgery. *Ann. Surg.* 1950, 132, 531-539.
12. BIGELOW W.G., LINDSAY W.K., HARRISSON R.C., GORDON R.A. et GREENWOOD W.F. - Oxygen transport and utilization in dogs at low body temperatures. *Amer. J. Physiol.* 1950, 160, 125-137.
13. BIGELOW W.G., MUSTARD W.J., EVANS J.G. - Some physiologic concepts of hypothermia and their application to cardiac surgery. *J. Thoracic Surg.* 1954, 28, 463-480.
14. BIGELOW W.G., WADEELL W.G., FAIRLEY H.B. - Improved management of clinical hypothermia based upon related biochemical studies. *Ann. Surg.* 1957, 146, 542-562.
15. BIGELOW W.G., FAIRLEY H.B., WADDEL W.G. - Hypothermia for cardiovascular surgery; acidosis in the rewarming period. *Brit. J. Anaesth.* 1957, 29, 310-318.
16. BING R.J., VANDAM L.D., GREGAIRE F. - Catheterization of the coronary sinus and the middle cardiac vein in Man - *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1947, 66, 239-240.
17. BING R.J. - Recherche sur l'irrigation coronarienne et le métabolisme du coeur humain. *Triangle* 1953 1, 57-61.
18. BING R.J., PEDERSEN A., SIEGEL A. - Cardiac metabolism in experimental ventricular fibrillation. *Amer. Heart* 1953, 52, 695-703.
19. BING R.J., SIEGEL A., EDWARDS W.S., TULUY S., RIBER W.G. - Coronary blood flow and myocardial metabolism in hypothermia. *Ann. Surg.* 1954, 139, 275-281.
20. BING R.J. - Studies on myocardial metabolism. *J. Clin. Invest.* 1954, 33, 1641-1646.
21. BING R.J., SIEGEL A., UNGAR I., GILBERT M. - Metabolism of the human heart. Studies on fat, ketone and amino-acids metabolism. *Amer. J. Med.* 1954, 16, 504-515

22. BING R.J. - Le métabolisme du coeur. Presse Médicale 1958, 66, 1015-1017.
23. BING R.J. - Studies on myocardial metabolism. Circulation 1955, 12, 635-647.
24. BING R.J., CASTELLANOS A., GRADEL E., LUPTON Ch. et SIEGEL A. - Experimental myocardial infarction. Circulatory, biochemical and pathologic changes. Amer. J. Med. Sci. 1956, 232, 533-554
25. BING R.J. - Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiete des Herzmuskelstoffwechsel. - 1^o Symposion an der Medizinischen Universitäts-Klinik Munster 1958, 31-62.
27. BING R.J., DANFORTH W.H., HOGANCAME Ch., BALLARD F.B. The myocardial metabolism of fructose. Amer. J. Med. Sci. 1959, 238, 477-484.
28. BING R.J., MICHEL G. - Myocardial efficiency. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1959, 72, 555-558.
29. BING R.J., BALLARD F.B., MICHEL G., NAEGLE S., DANFORTH W.H. - Metabolic changes in heart muscle during anoxia. Amer. J. Physiol. 1959, 197, 1147-1151.
30. BING R.J. - Metabolic activity of the intact heart. Amer. J. Med. 1961, 30, 679-691.
31. BING R.J., KLARWEIN M., KAKO K., CHRYSOHAN A. - Effect of atrial and ventricular fibrillation and ventricular tachycardia on carbohydrate metabolism of the heart. Circulation Research 1961, 9, 819-825.
32. BING R.J., ROTHLIN M. - Extraction and release of individual free fatty acids by the heart and fat depots. J. Clin. Invest. 1961, 40, 1380-1386.
33. BIZERTE G., DASSONVILLE B. - Les acides cétoniques du sang et de l'urine : étude analytique; identification d'hydrazones nouvelles. Clin. Chim. Acta 1956 1, 49-62.
34. BREVIN E.G., NEIL E. - Acid-Base studies during hypothermia. J. Physiol. (G.B.) 1954, 126, 26 P.
35. BREVIN E.G., GOULD R.P., NASHAT F.S. - An investigation of problem of acid-base equilibrium in hypothermia. Guy's Hosp. Rep. (G.B.) 1955, 104, 177-214

36. BREWIN E.G., NASHAT F.S., NEIL E. - Acid-base equilibrium in hypothermia. *Brit. J. Anaesth.* 1956, 28, 2-12.
37. BUEDING E., STEIN M.H., WORTIS H. - Blood pyruvate curves following glucose ingestion, in normal and thiamine deficient subject. *J. Biol. Chem.* 1941, 140, 697-703.
38. BUSCH H., HURLBERT R.B., VAN R. FOTTER - Anion exchange chromatography of the citric acid cycle. *J. Biol. Chem.* 1952, 196, 717-727.
39. CAVALLINI D., FRONTALI F. - Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* 1954, 13, 439-445.
40. CAVALLINI D., MONDONI B. - The use of formaldehyde to avoid artefacts in the chromatographic determination of keto-acids. *Clin. Chim. Acta* 1957, 2, 312-315.
41. CHAMBON P. - Présentation d'un "témoin mécanique" de densité optique. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*: 1961 6
42. CIER J.F., TANCHE M., BENOIT O. - Quelques aspects des effets de l'hypothermie sur le coeur de mammifères. *Arch. Mal. Coeur* 1958, 11, 1023-1036.
43. COVINO B.G., HANNON J.P. - Myocardial metabolic and electrical properties of rabbits and ground squirrel. *Amer. J. Physiol.* 1959, 197, 494-498.
44. COVINO B.G., D'AMATO H.E. - Mechanism of ventricular fibrillation in hypothermia. *Circulation Research* 1962, 10, 148-155.
45. DAJANI R.M., ORTEN J.M. - A study of citric acid cycle in erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1958, 231, 913-924.
46. DOLE V.P. - The relation between non esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.* 1956, 35, 150-154.
47. DASSONVILLE B. - Les acides cétoniques du sang et de l'urine - Thèse Médecine, Lille 1955, N° 64.
48. DETERLING R.A., NELSON E., BHONSLAY S., HOWLAND W. - Study of basic physiologic changes associated with hypothermia. *Arch. Surg.* 1955, 70, 86-94.

49. DILL. D.B., DALY C., FORBES W.H. - The pK^i of serum and red cells. J. Biol. Chem. 1937, 117, 569-579.
50. DILL D.B., EDWARDS H.T., CONSOLAZIO W.V. - Blood as a physicochemical system. J. Biol. Chem. 1937, 118, 635-648.
51. DILL D.B. et FORBES W.H. - Respiratory and metabolic effects of hypothermia. Amer. J. Physiol. 1941, 132, 685-697.
52. EL HAWARY M.F., THOMPSON R.H.S. - Separation and estimation of blood keto-acids by paper chromatography Biochem. J. 1953, 53, 340-347.
53. ENGELHARDT W.A., LJUBIMOVA - Myosine and adenosine triphosphatase. Nature (London) 1939, 144, 668-669.
54. ETTINGER R.H., GOLDBAUM L.R., SMITH L.H. - A simplified photometric method for the determination of citric acid in biological fluids. J. Biol. Chem. 1952, 199, 530-536.
55. FRIEDMANN Th.E., HAUGEN G.E. - Collection of blood for the determination of pyruvic and lactic acids. J. Biol. Chem. 1952, 144; 67-77.
56. FRIEDMANN Th.E., HAUGEN G.E. - The determination of keto-acids in blood and urine. J. Biol. Chem. 1943, 147, 415-442.
57. FLEKENSTEIN A., JANKE J., GERLACH E. - Konzentration und Turnover der energiereichen phosphate des Herzens nach Studien mit Papier chromatographie und Radio-phosphor. Klin. Wschr. 1959, 37, 451-459.
58. FROHMAN Ch.E., ORTEN J.M., SMITH A.H. - Chromatographic determination of the acids of the citric acid cycle in tissues. J. Biol. Chem. 1951, 193, 277-283.
59. FROHMAN Ch.E., ORTEN J.M., SMITH A.H. - Levels of acids of the citric acid cycle in tissues of normal and diabetic rats. J. Biol. Chem. 1951, 193, 803-807.
60. FÜRTH O., HERRMANN H. - Farbe Reactionnen der Weinsäure, Citronensäure und Aconitsäure. Biochem. Z. 1935, 280 448-457.
61. GORDON R.S., CHERKES A. - Unesterified fatty acids inhuman blood plasma. J. Clin. Invest. 1956, 35, 206-212.

62. GIRGELY J., MARTONOSI A., GOUVEA M.A. - Studies on actin. *J. Biol. Chem.* 1960, 235, 3169-3173.
63. GRAIG F.A., LANGE K., OBERMAN J., CARSON S. - A simple, accurate method of blood pH, determination for clinical use. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952, 38, 357-364.
64. GREEN D.E., GOBBERGER R.F. - Pathways of metabolism in heart muscle. *Amer. J. Med.* 1961, 30, 666-678.
65. GREENBERG J.C., EDMUNDS L.H., BROWN R.B. - Myocardial metabolism and post arrest function in the cold and chemically arrested heart. *Surgery* 1960, 48, 31-42.
66. HANNON J.P. - Effect of temperature on the heart rate, electrocardiogram and certain myocardial oxydation of the heart. *Circulation Research* 1958, 6, 771-778.
- 67.- HARTFORD C.G. - Rapid spectrophotometric method for the determination of itaconin, citric, aconitic and fumaric acids. *Anal. Chem.* 1962, 34, 426-428.
68. HEGNAUER A.H., SHRIBER W.J., HATERIUS H.O. - Cardiovascular response of the dog to immersion hypothermia - *Amer. J. Physiol.* 1950, 161, 455-465.
69. HELLIG D. - Der Energiestoffwechsel des Herzens bei Kreislauf unterbrechung und Herzstillstand in Hypothermie und seine Beziehungen zur Chirurgie. *Arch. Kreislaufforschung.* 1961, 36, 149-212.
70. HENNEMAN D.E., BUNKER J.P., BREWSTER W.R. - Immediate metabolic responses to hypothermia in man. *J. Applied. Physiol.* 1958, 12, 164-168.
71. HENSEL H. - Mensch und warmblütige Tiere Temperatur und Leben. page 328-466. H: Precht, J. Christophersen, H. Hensel 1956.
72. HERAUD G. - Données modernes concernant la structure et le métabolisme du myocarde - *Presse Médicale* 1960, 68, 1938-1940.
73. HILL A.V. - Abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. Roy. Soc. B.* 1949, 136, 399-420.
74. HORN H.D., AMELUNG D. - Die Bedeutung von Transaminasen und Milchsäuredehydrogenase-Bestimmung im Serum bei Leberkrankungen. *Dtsch. Med. Wschr.* 1957, 82, 619-626.

75. HUNTER G. - Deproteinisation of blood. *Biochem. J.* 1956, 62, 28 P.
76. HUXLEY H.E. - La contraction musculaire - Endeavour 1956, 15, 177-188.
77. JUDE J.R., HAROUTUNIAN L.M., FOLSE R. - Hypothermic myocardial oxygenation. *Amer. J. Physiol.* 1957, 190, 57-62.
78. JUVENELLE A.A., LIND J., WEGELIUS C. - A new method of extracorporeal circulation. Deep hypothermia combined with artificial circulation. *Am. Heart J.* 1954, 47, 692-736.
79. JUVENELLE A.A., LIND J., WEGELIUS C. - Quelques possibilités offertes par l'hypothermie générale profonde provoquée. - *Presse Médicale* 1952, 60, 973-978.
80. JUVENELLE A., NORBERG B., LIND J., BERGSTRAND A., WEGELIUS C. - Observations sur la biochimie du chien en hypothermie profonde. *J. Physiol.* 1953, 45, 633-654.
81. KAO F.F., SCHLIG B.B. - Impairment of gas transport and gas exchange in dogs during acute hypothermia. *J. Applied. Physiol.* 1956, 9, 387-394.
82. KAESER H., KAESER R., LESTRADET H. - Séparation et dosage par chromatographie sur papier des acides cétoniques sanguins et urinaires. *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.* 1959, 4, 138-145.
83. KIELLEY W.W., BRADLEY L.B. - The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.* 1956, 218, 653-659.
84. KETY S.S., SCHMIDT C.F. - Determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentration. *Amer. J. Physiol.* 1945, 143, 53-66.
85. KUHN E., SCHREIER K., WARNER W. - Stoffwechsel untersuchungen bei tiefer Hypothermien unter 20° und 1 angdauerndem artifiziellem Kreislaufstillstand. *Klin. Wschr.* 1959, 37, 651-654.

86. KÜHNE W. - Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. Leipzig 1864. Engelmann Leipzig.
87. KÜN E., GARCIA-HERNANDEZ M. - Identification and quantitative determination of keto-acids by paper chromatography. Biochem. Biophys. Acta 1957, 23, 181-186.
88. KREBS H.A. - Le cycle des acides tricarboxyliques. Exposés annuels de Biochimie Médicale, 1949, 10, 30-49.
89. KREBS H.A. - The place of the tricarboxylic acid cycle in cell metabolism. Symposium sur le cycle tricarboxylique, 2e Congrès international de Biochimie Paris 1952, 42-53.
90. KREBS H.A. - Aspects biochimiques de l'accumulation des corps cétoniques. Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 1573-1592.
91. LAKI K., CARROLL W.R. - Size of the myosin molecule Nature. 1955, 175, 389-390.
92. LEVY H.M., KOSLAND D.E. - Mechanism of hydrolysis of adenosine triphosphate by muscle proteins and its relation to muscular contraction. J. Biol. Chem. 1959, 232, 1102-1111.
93. LICHTWITZ A., HIOCO D., PARLIER R. et de SEZE S. - Acide citrique et métabolisme calcique - Presse médicale 1961, 69, 51-54.
94. LILLEHEI C.W., GOTT V.L., BARTLETT M., JOHNSON J.A., LONG D.M. - High energie phosphate levels in the human heart during potassium citrate arrest and selective hypothermic arrest. S. Forum 1959, 10, 544-547.
95. MANCUSO D., SULFINA D. - La fibrillazione ventricolare. Arch. Chir. Torace 1956, 13, 523-561.
100. MARIER J.R., BOULET M. - Direct determination of citric acid in milk with improved pyridin-acetic anhydrid method. J. of Dairy Sc. 1958, 41, 1683-1692.

- 100 bis. MAYER J.H., MORRIS G., de BAKEY M.E. -Effect on renal hemodynamics and an excretion of water and electrolytes in dog and man. *Ann. Surg.* 1957, 145, 26-40.
101. MAC ARDLE B. - A modified method for the microestimation of citric acid. *Biochem. J.* 1955, 60, 647-649.
102. MAC ARDLE B. - The quantitativ estimation of pyruvic and oxoglutaric acids by paper chromatography in blood, urine and cerebrospinal fluid. *Biochem. J.* 1957, 66, 144-148.
103. MEYERHOF O. - Die chemischen Vorgänge in Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeits leistung und Wärme Bildung. Berlin 1930. Springer Verlag.
104. MORALES P., CARBERY W., MORELLO A., MORALES G. - Alterations in renal function during hypothermia in man. *Ann. Surg.* 1957, 145, 487-499.
105. MUNIER R., MACHEBOEUF M., CHEFTEL I.R. - Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951, 33, 840-845.
106. NAGUIB N., BEERBOM E. - Chromatographie von organischen Säuren. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschung.* 1957, 9, 745-750.
107. NATELSON S., LUGAGOVAOY J.K., PINCUS J.B. - Microestimation of citric acid. *Biochem. J.* 1948, 175 745-750.
108. NIAZI S.A., LEWIS F.J. - Profond hypothermia in the dog. *Surg. Gynec. & Obst.* 1956, 102, 98-106.
109. NORDMANN J., NORDMANN R., GAUCHERY O. - Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1954, 36, 1461-1471. - *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1954, 36, 1641-1654.
110. NORDMANN J., NORDMANN R., DU RUISSEAU J.P.; GAUCHERY O. - Etudes sur le cycle tricarboxylique chez l'homme, au moyen de la chromatographie sur papier des acides organiques. *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.* 1956, 1, 67-78.

111. - NORDMANN J., NORDMANN R., MARTY A. - Détermination des acides organiques du plasma humain par chromatographie sur papier. C.R. Acad. Sci. 1957, 245, 2414-2417.
112. - NORDMANN J., NORDMANN R., MARTY A. - Chromatographie des acides organiques non volatils du plasma au cours de l'insuffisance rénale aigüe. Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1958, 3, 154-155.
113. - NORDMANN J., NORDMANN R. - Influence de l'anesthésie sur certains acides organiques du plasma. Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1958, 3, 687-688.
114. - NORDMANN J., NORDMANN R., MARTY A. - La citratémie au cours de l'insuffisance rénale. Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1959, 4, 454-461.
115. - NORDMANN J. - Technique de détermination des acides organiques non aminés du plasma et urines. Sem. Hôpit. supp. Path. Biol. 1960, 8, 1039-1041.
116. - OCHOA S., FLAVIN M. - Metabolism of propionic acid in animal tissues. J. Biol. Chem. 1957, 229, 965-1010.
117. - OLSON R.E., PIATNECK D.A. - Conservation of energy in cardiac muscle. Ann. N-Y Acad. Sci. 1959, 72, 466-479.
118. - OLSON R.E. - The contractile protein of heart muscle Amer. J. Med. 1961, 30, 692-707.
119. - OSBORN J.J. - Expérimental hypothermia : Respiratory and blood pH changes in to cardiac function. Amer. J. Physiol. 1953, 175, 389-398.
120. - OSTEUX R., LATURAZE J. Chromatographie sur papier des acides organiques fixes de l'urine humaine.
C.R. Acad. Sci. 1954, 239, 512-513.
121. - OSTEUX R., LATURAZE J. - Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils de l'urine humaine. Clin. Chim. Acta 1956, 1, 378-391.
122. - OSTEUX R., LATURAZE J. - Elimination urinaire des acides organiques dans le diabète. Clin. Chim. Acta 1960, 5, 259-263.

123. -- PENROD K.E. -- Oxygen consumption and cooling rates in immersion hypothermia in the dog. *Amer. J. Physiol.* 1949, 157, 436-447.
124. -- PENROD H.E. -- Cardiac oxygenation during severe hypothermia in dog. *Amer. J. Physiol.* 1951, 164, 79-85.
125. -- PENROD K.E., ROSENHAIN F.R. -- Blood gas studies in the hypothermic dog. *Amer. J. Physiol.* 1951, 166, 55-61.
126. -- PERRIER J.M. -- Dosage de l'acide citrique dans les poudres de lait et les laits concentrés. Thèse vétérinaire, Lyon 1961, N° 14.
127. -- PFLEIDERER G., DOSE K. -- Eine enzymatische Bestimmung des L- Milchsäure mit Milchsäuredehydrase. *Biochem. Z.* 1955, 326, 436-441.
128. -- POLONOVSKI M. -- Biochimie médicale, 1952.
129. -- PUCHER G.W., SHERMANN C.C., VICKERY H.B. -- A micro method for the determination of citric acid in biological fluids. *J. Biol. Chem.* 1936, 113, 235-245.
130. -- RAMOS J.G. -- Ventricular fibrillation in artificial hypothermia. *J. Thorac. Surg.* 1955, 31, 635-642.
131. -- RECHENBERGER J., BENNDORF S. -- Über den Citronensäurespiegel des Blutes. *Z. für Klin. Med.* 1957 154, 648-659.
132. -- REISSMANN K.R., VAN CITTERS R.L. -- Oxygen consumption and mechanical efficiency of the hypothermic heart. *J. Applied Physiol.* 1956, 9, 428-430.
133. -- ROBINSON H.W., PRICE J.W., CULLEN G.E. -- The values of pK' in the Henderson-Hasselbalch equation for human and dog sera, determined with the Simms electrode. *J. Biol. Chem.* 1934, 106, 7-27
134. -- ROBERTS H.E., POPPELL J.W., RANDALL H.T., VANAMIE P. -- Respiratory alkalosis. *Ann. N-Y Acad. Sci.* 1956, 66, 955-965.

135. ROSENTHAL T.B. - Effect of temperature on the pH of blood and plasma in vitro. J. Biol. Chem. 1948, 173, 25-30.
136. ROSS D.N. - Hypothermia - Guy's Hosp. Rep. (GB) 1954, 103, 97-115.
137. RUITTON P. - Etude comparée des électrophorèses sériques et urinaires dans les néphropathies. Thèse Médecine Lyon 1955, N° 308.
138. - SAFFRAN M., DENSTEDT O.F. - A rapid method for the determination of citric acid. J. Biol. Chem. 1948, 175, 849-855.
139. SAMUELSON O. - Ion-exchanges in analytical chemistry. Stockholm 1952.
140. - SCHNEIDER A., LACOSTE A.M., CARLES J. - Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 221-232.
141. SEITZ W., ENGLAHARDT-GÖLKE A., SCHAFFRY I. - Über eine fermentative Bestimmung des α ketoglutaräure Klin. Woch. 1955, 33, 228-234.
142. SEVERINGHAUS J.W., STUFFEL M. - Respiratory dead space increase following atropine in man and atropine, vagal ganglionic blockade and hypothermia in dogs. J. Applied. Physiol. 1955, 8, 81-87.
143. SEVERINGHAUS J.W., STUFFEL M., BRADLEY A.F. - Accuracy of blood pH and P_{CO_2} determinations. J. Applied Physiol. 1956 9, 189-196.
144. SEVERINGHAUS J.W.; STUFFEL M., BRADLEY R.F. - Effect of temperature on P_{CO_2} and P_{O_2} of blood in vitro J. Applied. Physiol. 1956, 9, 201-204.
145. SEVERINGHAUS J.W., STUFFEL M., BRADLEY A.F. - Variations of serum carbonic acid pK' with pH and temperature. J. Applied. Physiol. 1956, 9, 197-200.
146. SEVERINGHAUS J.W. - Respiration and hypothermia. Ann. N-Y Acad. Sci. 1959, 80, 384-394.
147. SINGER Th.P., BARRON E.S.G. - Effect of sulphhydryl reagents on adenosinetriphosphatase activity of myosin. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1944, 56, 120-124.

148. SINGER Th. P. - Electron transport in cardiac tissue
Ann. N-Y Acad. Sci. 1959, 72, 480-499.
149. VAN SLYKE D.D. - The bicarbonate concentration
of the blood plasma. J. Biol. Chem. 1917, 30,
288-346.
150. VAN SLYKE D.D. - Studies of acidosis - J. Biol. Chem.
1921, 48, 153-173.
151. VAN SLYKE D.D., HASTINGS A.B., SENDROY J. - The values
of pK' in the equation Hasselbalch-Henderson for
blood serum. J. Biol. Chem. 1928, 79, 183-192.
152. VAN SLYKE D.D., SENDROY J., HASTINGS A.B., NEILL J.M.
Studies of gas and electrolyt equilibria in blood.
J. Biol. Chem. 1928, 78, 765-799.
153. VAN SLYKE D.D., SENDROY J. - Line charts for graphic
calculation by the Henderson-Hasselbalch equation,
and for calculating plasma dioxide content from
whol blood content. J. Biol. Chem. 1928, 79-698.
154. STRAUB F.B., FEUER G. - Adenosine triphosphate. The
functionnal grup of actin. Biochim. Biophys. Acta
1950, 4, 455-470.
155. SWANN H., STEWART B.D., VIRTUE R. - Cardiac arrest
and ventricular fibrillation. Arch. Surg. 1953, 66
703-713.
156. SWANN H., ZEAVIN I., HOLMES J.P., MONTGOMERY V. -
Cessation of circulation in general hypothermia.
Ann. Surg. 1953, 138, 360-376.
157. - SWANN H., ZEAVIN I., BLOUNT S.G., R. VIRTUE -
Surgery by direct vision in the open heart during
hypothermia. J.A.M.A. 1953, 153, 1081-1085.
158. - SWANN H. - The current status of hypothermia -
A.M.A. Arch. Surg. 1954, 69, 597-601.
159. SWANN H., ZEAVIN I. - Cessation of circulation in
general hypothermia. Ann. Surg. 1954, 139, 385-396.
160. - Symposium on the myocardium. Its biochemistry and
biophysic. N-Y City 1960. Circulation 1961, vol.24
N° 2, 2e partie

161. Symposium an der Medizinischen Universitäts-Klinik
Munster Struktur und Stoffwechsel des
Herzmuskels 1958. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
 162. Symposium on the physiology of cardiac muscle
New-York 1961. Amer. J. Med. 1961, 30, 649-771.
 163. TAYLOR T.G. - A simplified method for the micro-
estimation of citric acid. Biochem. J. 1953,
54, 48-49.
 164. WEIL-MALHERBE H., BONE A.D. - The microestimation
of citric acid. Biochem. J. 1949, 45, 377-381.
 165. WHITE A., HANDLER Ph., SMITH E.L., STETTEN D.W. -
Principles of biochemistry. Mc-Graw-Hill, 1954.
 166. WYNN V. - The metabolism of fructose during hypo-
thermia in man. Clin. Sci. (GB) 1956, 15, 297-
304.
-

T A B L E D E S M A T I E R E S

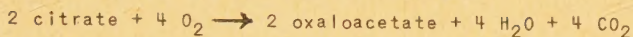
	pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - METABOLISME INTERMEDIAIRE ET ACTIVITE CONTRACTILE DU MYOCARDE	3
1. Métabolisme des glucides et cycle citrique	4
a) Métabolisme en anaérobiose	4
b) En métabolisme aérobie	5
2. Métabolisme des lipides	8
3. Métabolisme des amino-acides	11
Rôle de ces liaisons hautement énergétiques	13
CHAPITRE II - PARTICULARITES METABOLIQUES DU COEUR EN NORMOTHERMIE	17
CHAPITRE III - MODIFICATIONS OFFERTES PAR L'HYPOTHERMIE	21
CHAPITRE IV - DETERMINATION CHROMATOGRAPHIQUE	31
A. Déprotéinisation du plasma	33
1) Essai de déprotéinisation par la chaleur	33
2) Essai par un acide ou un alcool	34
3) Par dialyse	37
B. Chromatographie des métabolites	43
CHAPITRE V - DOSAGE DE QUELQUES ACIDES	51
A. Dosage des acides pyruvique, lactique et -céto-glutarique	51

CHAPITRE VI - RESULTATS EXPERIMENTAUX	63
1. Citratémie de l'animal normal	63
2. Chromatographie du sang de l'animal normal	64
3. Expérimentation chez le chien en hypothermie	67
DISCUSSION	83
CONCLUSIONS	89
BIBLIOGRAPHIE	93

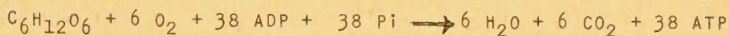
ERRATUM

- Page 7

Dans les 2 dernières formules : lire :

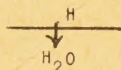


En somme :



- Page 16

Au bas du tableau : lire



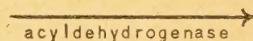
- Page 65

Au bas de la page : lire :

Les chromatogrammes de ce type ont été obtenus à partir des expérimentations décrites pages 85.

- Page 8

Au bas de la page (2), lire :



- Page 34 : La purification du méthanol est indiquée p. 47

- Page 100 : La numérotation passe de 95 à 100 sans interruption de Bibliographie.

